Aus dem Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend
Direktor: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

BEOBACHTUNGEN ÜBER DAS VERHALTEN PARENTERAL ZUGEFÜHRTEN SCHLEIMS

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Antonios Risos
aus
Larissa/Griechenland

1963

Aus dem Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend
Direktor: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

BEOBACHTUNGEN ÜBER DAS VERHALTEN PARENTERAL ZUGEFÜHRTEN SCHLEIMS

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

vorgelegt von
Antonios Risos
aus
Larissa/Griechenland

Dekan: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

Referent: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

Korreferent: Priv. Doz. Dr. med. Wolfgang Koransky

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 20. Sept. 1963

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A)	Einleitung	5
	1) Bisherige Untersuchungen	5
	2) Zur Chemie des epithelialen Schleims	7
	3) Über die histologische Färbbarkeit von Schleimstoffen	10
B)	Histologischer Teil	11
	1) Gewinnung und Bereitung des Schleims für die Implantationsversuche. Färbbarkeit des gewonnenen Schleims	11
	2) Implantation von Schleim an Mäusen	13
	3) Implantation von Schleim zusammen mit Holundermark an Mäusen	19
C)	Chemische Untersuchung	29
	1) Einleitung	29
	2) Bestimmung des Uronsäuregehaltes im Schleim	30
	3) Bestimmung des Hexosamingehaltes im Schleim	33
	4) Inkubation des Schleims mit Rattenserum und Ergebnisse	38
	5) Intraperitoneale Implantation von Schleim an Ratten und Ergebnisse	43
	6) Einspritzung von Schleim in der Subcutis der Ratte (SELYE-Taschen) und Ergebnisse	43
D)	Diskussion der Ergebnisse	50
E)	Zusammenfassung	56
F)	Literaturverzeichnis	59

A) Einleitung

Die Frage nach dem Schicksal von Schleim, der frei in das Gewebe gelangt, wurde erstmals gestellt im Zusammenhang mit dem Problem des Pseudomyxoma peritonei bei Cystoma ovarii bzw. bei der Mucocele des Proc. vermiformis (WERTH 1884, FRAENKEL 1901, 1912, u.a.). Ferner wurde das Problem in Verbindung mit manchen Parotisgeschwülsten untersucht (SCHILLING 1921). HAMPERL (1932) hat zuletzt das Verhalten nach Austritt von Schleim in das die Speichel- und Pylorusdrüsen umgebende Gewebe und (1944) in Zusammenhang mit dem Asthma bronchiale näher studiert.

Mit unserer Untersuchung haben wir versucht, das Verhalten des Schleimes systematischer zu behandeln, insbesondere sein Schicksal zu verfolgen. Zu diesem Zweck haben wir Fremdschleim in vorgebildete Höhlen und in den geschlossenen Gewebsverband implantiert.

Da nach den Angaben der bisherigen Literatur eine Reaktion seitens des jeweiligen, an den Schleim angrenzenden Gewebes von vornherein angenommen werden konnte, interessierte uns die Frage, ob etwa der eingebrachte Schleim für die Bildung des Reaktionsproduktes, insbesondere dessen Grundsubstanz, herangezogen wird.

WERTH (1884) hat als erster das Pseudomyxoma peritonei pathologisch-anatomisch eingehender untersucht und schreibt über die Vorgänge in der Bauchhöhle nach Erguß der Schleimmassen aus Ovarialcystomen: "Diese Massen bleiben infolge des Motus peristalticus durch die ganze Bauchhöhle verteilt in dieser liegen und wirken nun als ein an sich indifferenter Fremdkörper auf die Serosa, reizen diese zu Gefäß- und Bindegewebsneubildung, welche sich durch die aufgelagerten Massen verbreitet, sie in allen Richtungen durchwächst, parcelliert, sie mit Hilfe des zellulären Chemismus allmählich in ihrer chemischen Struktur verändert, und so wenigstens Bruchteile derselben, indem sie an deren Stelle tritt, zum Schwinden bringt".

WERTH nennt diesen ganzen Vorgang eine "plastische Fremdkörperperitonitis".

KRETSCHMAR (1897) überprüft die von WENDELER (1896) in Frage gestellten Ergebnisse von WERTH (1884), um zu Gunsten von WERTH zu folgern, daß "wenn also WENDELER die Erscheinungen einer Organisation der dem Peritoneum zunächst anliegenden Myxommassen nirgends nachweisen konnte, so muß ihm erwidert werden, daß eben das von ihm geschilderte vom Peritoneum ausgehende junge Bindegewebe die vermißte Organisation im Sinne von WERTH darstellt".

Die Ergebnisse der ersten Arbeit von FRAENKEL (1901) weichen von den Ergebnissen von WERTH (1884) insofern ab, als FRAENKEL keine Veränderungen im Sinne einer Organisation der Schleimmassen in der Bauchhöhle feststellen konnte. In seiner zweiten Arbeit nähert sich FRAENKEL (1912) den Ansichten von WERTH wenn er sagt: "Das Peritoneum reagiert auf den Reiz dieser zunächst aseptischen Massen mit der Bildung bindegewebiger Produkte, die die Gallerte vielfach einkapseln und nach der Ansicht von WERTH, die von vielen Forschern geteilt wird, hier und da organisieren". FRAENKEL bezieht sich dabei auf das Pseudomyxom bei Cystoma ovarii. In Bezug auf das Pseudomyxoma peritonei bei der Mucocele des proc. vermiformis stimmen die Ergebnisse von FRAENKEL mit denen von HUETER (1907) überein, welcher ausführt : "Der Reiz, den der ergossene Schleim auf die peritoneale Fläche ausübt, wird durch eine reaktive Entzündung beantwortet, welche mit Produktion von Bindegewebe einhergeht".

HAMPERL (1932) bemerkt in seiner Arbeit über Schleimgranulome und glanduläre Erosionen: "Die entzündlichen Erscheinungen um solche Herde (i.e.: von ergossenem Schleim in der Umgebung von Schleimdrüsen) sind als eine Art von Fremdkörperreaktion auf den ausgetretenen Schleim aufzufassen. Sie führen zu Abkapselung bzw. Resorption des Schleims oft unter Bildung eines eigentümlichen Granulationsgewebes".

Die gleiche Art von Reaktionen stellt HAMPERL (1944) in der Umgebung von Schleim in Zusammenhang mit dem Asthma bronchiale fest.

SCHILLING (1921), der histologisch die Vorgänge nach Schleimaustritt aus der Parotis bei manchen Geschwülsten dieser Drüse untersucht hat, stellte ähnliche Reaktionen fest wie HAMPERL.

LETTERER (1959) führt im Lehrbuch der allgemeinen Pathologie bei der Besprechung der Pathologie der Mucine und Mucoide an, daß die Resorptionsmöglichkeit von Schleim außerordentlich beschränkt ist. Unter Normalverhältnissen wird das Produkt so abgegeben, daß auch gleichzeitig seine Eliminierung aus dem Körper eintritt (Mund, Bronchien, Magen, Darm, Vulva). Hierbei besteht also keine Veranlassung zur Resorption von Schleim. Wird der Organismus aber vor die Aufgabe der Resorption von Schleim gestellt, etwa bei der Absonderung größerer Schleimmengen in die Bauchhöhle als Folge einer geplatzten Mucocele der Appendix oder eines Pseudomucincystoms des Ovarium, dann ist eine Resorption fast unmöglich (Pseudomyxoma peritonei).

Untersuchungen über die chemische Beschaffenheit von Zervikalschleim bei Frauen ergaben, daß dieser bei schwangeren Frauen 45 % Kohlenhydrate und 55 % Peptide enthält, in denen alle gewöhnlichen Aminosäuren außer Methionin nachgewiesen wurden.

Die einzelnen Zucker bzw. Aminosäuren könnten nicht vor einer Hydrolisierung des Schleimes nachgewiesen werden. Sie sind in Form von Mukoproteiden vorhanden.

WERNER (1953) gibt an, daß der Schleim unlöslich in aqua dest. und Salzlösung (saline) von pH 7,3 und bei Zimmertemperatur oder bei 37° C auch dann ist, wenn die "originale Schleimstruktur" durch mechenisches Rühren zerstört wurde.

Außerdem wurde vermerkt, daß der Schleim sich leicht in starken Mineralsäuren und Alkalien lösen läßt.

Trypsin-Verdauung in Phosphat-Puffer von pH 7,8 und 37° C für 24 h führte "fast totale Lösung des Schleims herbei". Diese Lösung "war nicht sehr viskös."

Aus diesem Trypsin-Experiment zieht WERNER den Schluß, daß für die Gelstruktur des Mucus das Protein erforderlich (essential) sei.

Sowohl WERNER (1953) als auch DISCHE - SCHETTLES - OSNOS (1951) stimmen überein in dem Punkt, daß im Zervikal-Schleim keine freien Mono- oder Oligosaccharide vorhanden sind.

Über die qualitative Zusammensetzung der K. H. -Komponente sind die Autoren insofern einig, als sie alle Hexosamin, Galaktose und Fucose nachgewiesen haben und daß das Hexosamin quantitativ einen großen Anteil an der Zusammensetzung der K. H. -Komponente des Schleims ausmacht. (Tabelle 1 und 2).

"Die verschiedenen Monosaccharide scheinen" - sagt WERNER - "die gleichen beim schwangeren und nicht-schwangeren Uterus zu sein. Gleich ist auch das Quantitätsverhältnis der einzelnen Zucker. Der Unterschied zwischen der K. H. -Komponente des Schleims aus der Cervix des schwangeren und nicht-schwangeren Uterus besteht darin, daß im ersten Fall dreimal soviel vom einzelnen Zucker enthalten ist".

Die Autoren stimmen darin überein, daß gemäß der Zusammensetzung der Schleim-Polysaccharide diese große Ähnlichkeit mit den in den menschlichen Blutgruppen-Substanzen enthaltenen Polysacchariden haben. (Die angeführten Untersuchungen wurden alle am menschlichen Zervikalschleim durchgeführt).

Schließlich schreibt WERNER (1953): "Es scheint sicher, daß die K. H. -Komponente des Glucoproteins (im menschlichen epithelialen Schleim) chemisch mit der Peptid-Komponente verbunden ist. Der

Tabelle 1

Zusammensetzung menschlichen Zervikalschleims
(nach WERNER 1953)

Material	Gehalt an Procent Trockengewicht				
	Stick-stoff	Hexos-amin	Fucose	Galac-tose	Sial-säure
1) Zervikalschleim des nichtschwangeren Uterus	12·1	5·8	1·5	4·2	3·7
2) Schleimpropf bei Schwangerschaft	8·8	17·8	4·8	11·2	12
3) Angereicherte Schleimpröpfe des schwangeren Uterus	8·6	17·2	4·8	10·5	10·5

Tabelle 2

Zusammensetzung von Schleim-Fraktionen (ausgedrückt in mg% Feuchtgewicht), die durch 90%iges Aethanol von angereicherten Schleimpröpfen des Zervix Uteri gefällt wurden.
(Nach DISCHE, SCHETTLES und OSNOS 1951)

Probe Nr.	Methyl-Pentose	Galac-tose	Glu-cose	Hexos-amin	Ratio Galactose Hexos-amin	Ratio Galactose Methyl-pentose	Gesamt-Mucopo-lysac-charid
I	64·2	134	140	152·2	0·88	2·1	351
II	57·5	176	34	154	1·14	3·05	387·5
III	20·4	50	29			2·45	

auffallend hohe Gehalt an Threonin und in den meisten Fällen auch von Serin könnte darauf hindeuten, daß die Hydroxylgruppen dieser zwei Aminosäuren in diese Bindung einbezogen sind, d.i. verbunden mit der Glycosid-Gruppe eines der Zucker."

Bezüglich der histologischen Färbbarkeit ist zu sagen, daß Schleim sich mit verschiedenen Farbstoffen färbt (darüber s. LISON 1936, ROMEIS 1948 u.a.).

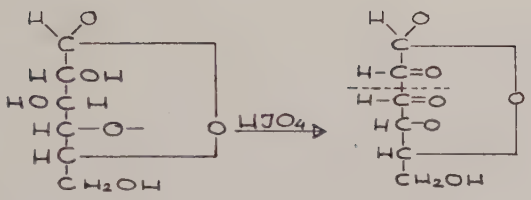
An erster Stelle steht die Eigenschaft des Schleims, sich mit basischen Farbstoffen zu färben, wenn die im Schleim enthaltenen Polysaccharide zu den sauren Polysacchariden gehören (LISON 1936). Als sauer werden diejenigen Polysaccharide bezeichnet, deren einzelne Monosaccharide mit Schwefelsäure verestert sind bzw. eine -COOH Gruppe enthalten und dadurch zu den -Uronsäuren zählen (näheres zur Chemie der Mucopolysaccharide s. BLIX - GARDELL 1960 und STACEY 1958).

Durch die Eigenschaft, sich mit basischen Farbstoffen zu färben, besitzt der Schleim die Fähigkeit, sich metachromatisch zu verhalten. Als dafür geeignete Farbstoffe gelten Toluidinblau oder Thionin.

Der metachromatische Farbwechsel ist keine quantitative Reaktion. Es bestehen keine definierten stöchiometrischen Verhältnisse zwischen der Menge des Farbstoffes und der vorhandenen färbbaren Substanz (LISON 1936). Man weiß nur, daß zum metachromatischen Farbwechsel Säuregruppen nötig sind, wie auch ein verhältnismäßig hoher Polymerisationsgrad der Polysaccharide.

Andere charakteristische Schleimfärbungen sind die P.A.S. Färbung (Perjodsäure-Schiff-Reagenz) und die Färbung nach BAUER (LISON u.a.).

Die P.A.S. Färbung beruht darauf, daß unter der Einwirkung der Perjodsäure (HJO_4) auf zwei benachbarte Glycol-Gruppen Aldehyd-Gruppen entstehen:



Dabei geht die makromolekulare Struktur der Verbindung nicht zugrunde, obwohl eine Spaltung des Ringes zwischen C_2 und C_3 stattfindet.

Das Reagenz von SCHIFF geht mit den entstandenen Aldehyden nach einer Serie von Zwischenverbindungen in ein Produkt über, das die charakteristische rot-violette Farbe besitzt.

Die Reaktion von BAUER funktioniert ähnlich, ein Unterschied besteht insofern, daß statt der Perjodsäure Chromsäure für die Oxydation der Zucker zu Aldehyden benutzt wird. (Die entstandenen Aldehyde reagieren, wie bei der P.A.S.-Färbung mit dem SCHIFF Reagenz).

B) Histologischer Teil

Für unsere Untersuchungen haben wir Schleim aus dem Gebärmutterhals sowohl von trächtigen als auch nichtträchtigen Kühen gesammelt. Der gewonnene Schleim, der sehr zäh war - man könnte ihn mit der Schere schneiden - war nur geringfügig durch Blutspuren verunreinigt.

Das Material wurde gleich nach der Gewinnung gefriergetrocknet und anschließend in einen Vakuum-Exsikkator gebracht, damit auch die letzten Flüssigkeitsspuren entfernt werden.

Die erhaltene Trockensubstanz ist cremefarbig, auffallend leicht, faserig gebaut und hat äußerlich große Ähnlichkeit mit Puff-Reis.

Es ergab sich aus zahlreichen Wägungen, daß die Trockensubstanz etwa 20% des Gewichtes des nativen, feuchten Schleims ausmacht.

Mit diesem Material haben wir verschiedene Färbungen getestet und fanden, daß die Färbung mit P.A.S. die besten Resultate gibt. Die Fixierung erfolgte in 10%iger Formollösung. Für die Versuche wurde sowohl mit Trockenschleim als auch mit nativem Schleim sowie mit Trockenschleimlösungen verschiedener Konzentrationen gearbeitet. (Abb.

Abb. 1: Nativer Schleim; P.A.S.-Färbung
Vergr. 1 : 170

Den Trockenschleim in destilliertem Wasser zu lösen, ist nicht leicht. Schließlich gelang es, mit Hilfe eines Gewebehomogenisators ein Gemisch herzustellen, in dem der Trockenschleim im Wasser jeweils gleichmäßig verteilt war. Das durch Blutspuren verunreinigte Material wurde für die Implantationen nicht verwendet.

Im ersten Arbeitsgang wurden 12 Mäuse mit Schleim geimpft. Nachdem die Gegend um die Inguinalfalte der Tiere mit einer Schere kurzgeschoren worden war, wurde dortselbst unter leichter Äthernarkose ein ca. 1 cm langer, der Medianachse der Tiere ungefähr parallel laufender Haut-Schnitt gelegt, ohne die darunter gelegene Fascie bzw. Muskulatur zu lädieren. Anschließend haben wir, von der Schnittöffnung ausgehend, die Haut von ihrer Unterlage stumpf gelöst, soweit es für die Unterbringung des Implantates nötig war. Die Wunde wurde verschlossen mit Hilfe von zwei kleinen Metallklemmen.

Nach dem Eingriff wurden die Tiere in Drahtkästen gehalten. Futter und Trinkwasser bekamen sie ad libitum.

Bei anderen Tieren wurde durch einen kleinen Scherenschnitt - nach Entfernung der Bauchhaare - die Bauchhaut durchgeschnitten und anschließend das Peritoneum eröffnet, so daß in die Bauchhöhle Schleim eingebracht werden konnte. Das Peritoneum dieser Tiere wurde mit dünnem Faden, die Haut mit Metallklemmen zusammengefaßt. Auf diese Weise verimpften wir subcutan einem Tier links 0,3 ml Nativ-Schleim und rechts ca. 0,3 cm^3 Trockenschleim (Tier I).

Zwei weitere Tiere erhielten rechts und links in der Subcutis der Leistengegend je 0,5 ml einer 4-5%igen Trockenschleimlösung (Tiere II und III).

Drei weiteren Tieren gaben wir in die Bauchhöhle je 0,5 cm^3 Trockenschleim (Tiere IV, V und VI).

Ein Tier bekam ca. 0,7 ml 20%iger Schleimlösung intraperitoneal (Tier VII).

Ein Tier wurde wie das Tier VII behandelt, nur mit dem Unterschied, daß ihm statt der 20%igen eine 10%ige Lösung einverleibt wurde (Tier VIII).

Zwei anderen Tieren (IX und X) wurden ca. 0,7 ml einer 4-5%igen Lösung in die Bauchhöhle eingebracht.

Bei dem Tier X haben wir den Schleim vor der Implantation für 10 min im Autoklaven von 120° C "sterilisiert".

Zwei weiteren Tieren (XI und XII) haben wir ebenfalls Schleim nach vorheriger "Sterilisation" einverleibt. Tier XI erhielt ca. 1 ml 20%iges Material, Tier XII ca. 0,5 cm^3 Trockenmaterial.

In der Tabelle 3 ist die Versuchsanordnung schematisch dargestellt.

Vier Tiere (III, VII, VI, IX) sind am zweiten Tag nach der Implantation tot vorgefunden worden. Drei davon gehörten zu denen, denen wir den Schleim in die Bauchhöhle eingebracht hatten, ein Tier hatte das Implantat in die Subcutis erhalten.

Bei den zugrunde gegangenen Tieren ließen sich einwandfreie Befunde wegen Fäulnisveränderungen nicht erheben.

Die am Leben gebliebenen Tiere wurden sieben Tage nach der Implantation getötet und untersucht.
Makroskopisch stellten wir fest, daß der implantierte Schleim außer bei Tier IV, XI, XII nicht mehr wahrzunehmen war.

Der Inguinal-Lymphknoten der Tiere, bei denen in der Inguinal-Gegend Schleim implantiert worden war, zeigte in fast allen Fällen eine etwa erbsengroße Schwellung.

Die Bauchhöhle des Tieres IV enthielt eine schaumige fadenziehende Flüssigkeit.

Beim Tier XI zeigte der in die Bauchhöhle implantierte Schleim bezüglich seiner Zähigkeit und seines Aussehens den gleichen Zustand wie am Tage der Implantation. An manchen Stellen (z. B. am unteren Leberrand) hatte man den Eindruck, daß er fest mit seiner Unterlage verhaftet war, mikroskopisch haben wir jedoch keine Verwachsung nachweisen können.

Beim Tier XII fanden wir das Gleiche wie beim Tier XI, nur mit dem Unterschied, daß der Schleim gequollen schien.

Tabelle 3

Schleim-Implantation an Mäusen

Tier	Ort der Implantation	Art und Menge des Materials	Dauer der Implantation	Bemerkungen
I	Subcutan	links: 0,3 ml 20%iger Schleim rechts: 0,3 cm^3 Trockenschleim	7 Tage	
II	Subcutan	rechts: 0,5 ml 4-5%ig. Schleim links: dto.	7 Tage	
III	Subcutan	rechts: 0,5 ml 4-5%ig. Schleim links: wie oben	2 Tage	Tier zugrunde gegangen
IV	Intraperitoneal	0,5 cm^3 Trockenschleim	7 Tage	
V	Intraperitoneal	wie oben	7 Tage	
VI	Intraperitoneal	wie oben	2 Tage	Tier zugrunde gegangen
VII	Intraperitoneal	0,6-0,8 ml 20%ige Schleimlösung	2 Tage	
VIII	Intraperitoneal	0,6-0,8 ml 10%ige Schleimlösung	7 Tage	
IX	Intraperitoneal	0,6-0,8 ml 4-5%ige Schleimlösung	2 Tage	Tier zugrunde gegangen
X	Intraperitoneal	wie oben	7 Tage	) Schleim vor der Implantation für 10 min im Autoklaven von 120° C gebracht.
XI	Intraperitoneal	1 ml 20%ige Schleimlösung	7 Tage	
XII	Intraperitoneal	ca. 0,5 cm^3 Trockenmaterial	7 Tage	

Von allen Tieren wurden zur histologischen Untersuchung Gewebsteile aus Lunge, Leber, Pankreas, Milz, verschiedenen Darmabschnitten und Peritoneum der Bauchwand entnommen. Außerdem wurde Fascien- und Muskelgewebe der Inguinal-Gegend von denjenigen Tieren entnommen, die dort Schleim erhalten hatten.

Histologische Befunde:

a) Gewebsproben aus der Inguinalgegend:

Der Schleim ist an manchen Stellen noch deutlich an seiner fädigen Struktur und seiner P.A.S.-positiven Färbbarkeit zu erkennen (Abb. 2).

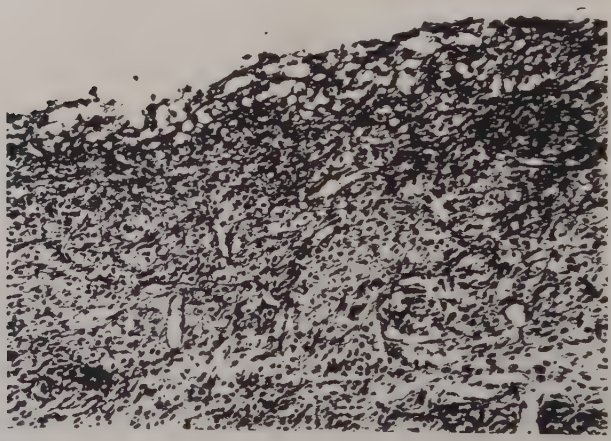


Abb. 2 Leistenbeuge der Maus 7 Tage nach Implantation 20%igen, nativen Schleims. - Resorptionsgewebe.

Die äußeren Schichten des Schleims, die dem Gewebe anliegen, stellen ein lockeres Netzwerk dar. Darin sind einzelne Leukozyten verstreut. An anderen Stellen geht der Schleim mehr oder weniger unscharf in ein aus runden Zellen bestehendes Gewebe über. Die Zellen dieses Gewebes besitzen verhältnismäßig klein und intensiv gefärbte Kerne, während das reichliche Cytoplasma hell, fast optisch leer erscheint. Bei diesen Zellen handelt es sich offensichtlich um Histiozyten.

Die Zellen liegen in einem Maschenwerk von Fasern, das umso undeutlicher und spärlicher wird, je weiter man sich dem Schleim nähert.

Außer Histiozyten findet man ovale bis unregelmäßig gestaltete Zellen mit einem großen, stark gefärbten Kern und außerdem vielfach mit feinen Ausläufern.
Diese Zellen entsprechen Fibroblasten bzw. Fibrocyten.

b) Gewebsproben aus der Bauchhöhle:

Bei einem Tier (IX), dem der Schleim in die Bauchhöhle geimpft war, findet man das Implantat mikroskopisch in Form eines dichten Netzwerkes auf der Hinterwand der Bauchhöhle und zwar in der Nähe der Umschlagsfalte des Peritoneum viscerale.

Von dem subperitonealem Gewebe geht ein an manchen Stellen junges Proliferations-Gewebe aus, das in den Schleim von allen Richtungen eindringt, diesen gewissermaßen auflösend und ersetzend (Abb. 3).

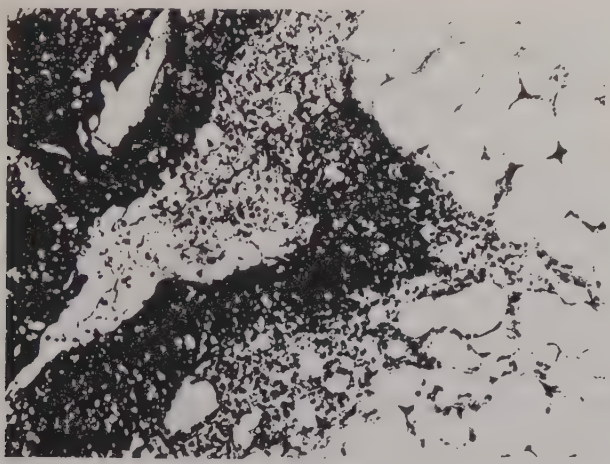


Abb. 3 Peritonealwand der Maus 7 Tage nach Implantation 5%igen Schleims.
Aufquellung vom Schleim; zellige Infiltration.

In diesem Granulationsgewebe finden sich außer Leukozyten die weiter oben beschriebenen mesenchymalen Zellelemente sowie auch zahlreiche Kapillaren.

Bei anderen ebenfalls intraperitoneal geimpften Tieren beobachteten wir eine von der Darmserosa ausgehende pilzartig wachsende Zellwucherung, bestehend aus sich mit P.A.S. deutlich rot-violett färbenden großen runden Zellen, bei denen es sich wohl um histiozytäre Elemente handelt. Daneben befinden sich dort großkernige, grau-blau tingierte platte Zellen, die sich schwer voneinander abgrenzen; sie erinnern an Riesenzellen. In der Tat läßt sich feststellen, daß es sich um Synzytium von gewucherten peritonealen Deckzellen handelt, wie schon von FRAENKEL[+)] beschrieben. An den inneren Organen ist kein besonderer Befund außer in der Leber zu erheben.

Dort findet sich in den Parenchym-Zellen, die rings um die Zentralvene liegen, eine Häufung von P.A.S.-positiven Granula.

Mit den von der Leber stammenden Schnitten haben wir folgende Probe vorgenommen: Paraffinschnitte wurden entparaffiniert und mit Menschenspeichel beschickt, sodann in eine feuchte Kammer gebracht.

Die so behandelten Präparate wurden zusammen mit zwei nicht mit Speichel beschickten Kontrollschnitten in einem Brutkasten bei 37° C für etwa 2 Stunden inkubiert. Danach wurden die Präparate in üblicher Weise mit P.A.S. gefärbt. Dieser Versuch wurde durchgeführt, um festzustellen, ob die P.A.S.-posivite Granulierung der Leberparenchymzellen die Speichel-Behandlung überstehen würde, was bedeuten würde, daß die Granula keine Glykogen-Granula wären, die bekanntlich durch die Speichel-Amylase aufgelöst werden und somit keine Farbreaktion mehr geben. Wir konnten feststellen, daß die Granula verschwanden und demnach Glykogen-Granula darstellen.

[+)] (1901)

Um die Reaktionen, die im Zuge der Resorption und Organisation ablaufen, von jenen zu differenzieren, die in einer Organisation und Demarkation bestehen, entschlossen wir uns, den Schleim mit einem anderen Material zu verabreichen, dessen Schicksal - in diesem Falle die Demarkation - im voraus anzunehmen war.

Dazu wählten wir Holundermark. Die Holunderstäbe wurden geschält und aus dem weichen Mark wurden scheibenförmige Querschnitte geschnitten, fixiert und gefärbt; P.A.S. stellt das Holundermark gut dar, während Hämatoxylin-Eosin die Holunderscheibchen nur schwach anfärbt.

Für die Implantationsversuche wurden kleine zylindrische Stücke von Holundermark bereitet, die eine Höhe von 0,5 - 0,7 cm und einen Durchmesser von ca. 0,5 cm besaßen. An der hohen Seite dieser Zylinder wurde keilförmig ein bis an das Zentrum reichendes Markstück entfernt, die ganze Höhe des Zylinders einnehmend.

Die somit entstandene Lücke wurde mit pulverisiertem Trockenschleim gefüllt und der so präparierte Zylinder vorsichtig, damit der Pulverschleim nicht verstreut wird, durch einen Knopflochschnitt in die Inguinalgegend der Maus, unmittelbar unter die Haut eingeführt.

Außerdem wurden andere Holundermark-Zylinder bereitet von etwa 1 cm Höhe und 0,3 - 0,5 cm Durchmesser, deren zentralgelegenes Mark mit Hilfe einer Punktionsnadel entfernt wurde, so daß daraus ein röhrenförmiges Gebilde entstand, das den Vorteil bot, auch flüssigen Schleim aufnehmen zu können. Dieser Zylinder bietet bei der Untersuchung eine größere Übersicht, wenn der zentralgelegene mit Schleim gefüllte Kanal beim Schneiden des Zylinders in der Längsachse in seiner ganzen Ausdehnung eröffnet wird.

Mit dem zuerst beschriebenen Zylinder wurden zwei Reihen angesetzt;

sechs Tieren (Gruppe A) wurde links subcutan in der Inguinalgegend Holundermark plus Trockenschleim, rechts dagegen nur Holundermark implantiert.

Die Tiere der zweiten Gruppe (Gruppe E), aus fünf Tieren bestehend, erhielten in der Subcutis der Inguinalgegend rechts nur Trockenschleim (0,4 - 0,5 cm^3), während links Holundermark und Trockenschleim appliziert wurde.

Mit einem Holundermarkzylinder, der einen zentralen Kanal enthält, wurden weitere fünf Tiere behandelt (Gruppe D).
Den Tieren wurde in das Unterhautgewebe der Leistengegend links der Zylinder mit 10%iger Trockenschleimlösung gefüllt, eingepflanzt, während das rechts implantierte Holunderröhrchen 20%ige Schleimlösung enthielt.

Außerdem wurden zwei Tieren 20%ige Trockenschleimlösung (ca. 1 ml) intraperitoneal injiziert (Gruppe K).

Eine fünfte aus sechs Tieren bestehende Versuchsreihe (Gruppe F) wurde angesetzt, indem wir den Tieren links in die Subcutis der Inguinalgegend ein durchbohrtes Röhrchen mit 10%iger Schleimlösung, rechts dagegen ein leeres Röhrchen einpflanzten.

Schließlich erhielt ein Tier (Tier C) - ebenfalls in der Leistengegend - links ca. 0,5 cm^3 Trockenschleim allein und rechts 10%ige Trockenschleimlösung allein (ca. 0,5 ml).

Von der Gruppe A wurde je ein Tier nach 24, 48 und 72 Stunden durch Dekapitation getötet.
Zwei Tiere sind - eins am dritten, eins am fünften Tag nach der Implantation - aus unbekannter Ursache ad exitum gekommen. Das sechste Tier dieser Gruppe wurde am sechsten Tag nach der Implantation getötet.

Von der Gruppe E wurde ebenfalls je ein Tier nach 24, 48 und 72 Stunden getötet. Zwei Tiere dieser Gruppe kamen ad exitum; das eine nach

etwa 48 Stunden, das andere sechs Tage nach der Implantation.

Aus der Gruppe D ist das erste Tier nach 24 Stunden, das zweite nach 72 Stunden, das dritte nach sechs Tagen, das vierte nach sieben Tagen und das letzte nach acht Tagen getötet worden.

Von den Tieren der Gruppe F wurden je eins nach fünf, neun und elf Tagen und die restlichen nach zehn Tagen getötet.

Das erste Tier der Gruppe K wurde am ersten Tag, das zweite fünf Tage nach der Implantation getötet.

Das Tier C schließlich wurde sechs Tage nach der Implantation dekapitiert.

Die Versuchsanordnung ist in der Tabelle 4 zusammengestellt.

Bei der Sektion haben wir dort, wo die Mäuse das Implantat in der Leistengegend trugen, einen von der Symphyse bis zur Bauchmitte reichenden Bauchschnitt gelegt, so daß die Leistengegend zusammen mit dem Peritoneum in toto exstirpiert werden konnte. Das so gewonnene Material wurde in 5%iger Formalinlösung fixiert.

Die Sektion der Tiere mit den Implantaten in der Inguinalgegend bot makroskopisch ein einheitliches Bild, obwohl die einzelnen Befunde von Fall zu Fall graduell verschieden ausgeprägt waren.

Wir stellten fest, daß das implantierte Material, das schon unmittelbar nach der Implantation die Leistengegend der Tiere deutlich vorgetrieben hatte, ausnahmslos an Umfang zugenommen hatte. Die entfernte Gegend bot bei der Palpation - von der Innen- wie auch von der Außenseite her - den Eindruck, als ob sie eine homogen-teigige bis prallelastische Masse enthielte. Darüber hinaus imponierte zentral ein fester Kern, der von einer weniger festen Masse umgeben war. Dieser Befund war unabhängig davon, ob das jeweilige Implantat nur aus Schleim bestand oder ob dieser außerdem auch noch Holunder-

Tabelle 4

Schleim + Holundermark-Implantation an Mäusen

Gruppe	Art der Implantation	Art des Implantats	Dauer der Implantation	Bemerkungen
A 1)	Subcutis der Inguinalgegend	links: Holunder + Trockenschleim rechts: nur Holundermark	24 Std.	
2)	"	"	48 Std.	
3)	"	"	3 · 24 Std.	
4)	"	"	3 · 24 "	Exitus let.
5)	"	"	5 · 24 "	"
6)	"	"	6 · 24 "	
E 1)	Subcutis der Inguinalgegend	links: Holunder + Trockensubstanz rechts: nur Trockenschleim (0,4 - 0,5 cm^3)	24 Std.	
2)	"	"	2 · 24 Std.	
3)	"	"	3 · 24 "	
4)	"	"	2 · 24 "	Exitus let.
5)	"	"	6 · 24 "	"
D 1)	Subcutis der Leistengegend	links: Holunderröhrchen + 10%ige Trockenschleimlösung, rechts: Holunderröhrchen + 20%ige Trockenschleimlösung	24 Std.	
2)	"	"	3 · 24 Std.	
3)	"	"	6 · 24 "	
4)	"	"	7 · 24 "	
5)	"	"	8 · 24 "	
F 1)	Subcutis der Leiste	links: Röhrchen + 10%iger Schleimlösung, rechts: nur Holunderröhrchen	5 · 24 Std.	
2)	"	"	9 · 24 Std.	
3)	"	"	11 · 24 "	
4)	"	"	10 · 24 "	
1 5)	"	"	10 · 24 "	
6)	"	"	10 · 24 "	
K 1)	Intraperitoneal	1 ml 20% Schleimlösung	24 Std.	
2)	"	"	5 · 24 Std.	
C 1)	Subcutis der Leiste	links: 0,5 cm^3 Trokkenschleim, rechts: 0,5ml 10%ige Schleimlösung	6 · 24 Std.	

mark enthielt. Nur dort, wo ein leerer Holundermark-Zylinder implantiert war, zeichnete sich derselbe durch die Häute hindurch ab.

Weiter konnten wir feststellen, daß die Gegend über dem Implantat - von der Bauchhöhle also der Peritonealseite her betrachtet - durch eine starke Hyperämie ausgezeichnet war, die sich in die Umgebung - vor allem kopfwärts - diffus ausbreitete und bei manchen Tieren extreme Grade erreichte, so daß fast der Eindruck eines kapillären Hämatoms erweckt wurde. Die Hyperämie sah umso frischer aus, je weniger Zeit zwischen Implantation und Tötung verstrichen war.

Bei einem Tier der Gruppe F (F_3) ließ sich links kein Implantat mehr finden, es war offensichtlich abgestoßen, zumal die Operationswunde klaffte.

Bei einem Tier der gleichen Gruppe (F_4 links) wurde vom Peritoneum aus ein kleiner Schnitt in die entfernte Gegend gelegt. Aus diesem Schnitt ergoß sich eine klare, fadenziehende Flüssigkeit, die weiter nach dem Zentrum des Implantats in ein weißlich-gelbes teigiges Homogenat überging, das den Holunderzylinder allseitig umgab. Das Holundermark war weich, so daß man eine Durchsaftung desselben annehmen konnte.

Der eben beschriebene Befund wurde in genau der gleichen Form bei dem Tier D_2 erhoben.

Eine Abhängigkeit des Befundes von der Art des verwendeten Zylinders - d.h. röhrenförmig oder keilförmig ausgehöhlter Zylinder wie auch von der Art des verwendeten Schleims - Trockenschleim oder flüssige Schleimlösung - ließ sich nicht feststellen. Ebensowenig war makroskopisch eine sichere Abhängigkeit von der Zeit nachweisbar, die zwischen Implantation und Tötung der Tiere verstrichen war. Die Beschaffenheit des Implantates und der Implantatumgebung war bis auf die beschriebene Hyperämie immer gleichartig.

Nach der Verimpfung von 20%iger Trockenschleimlösung boten die Tiere bei der Sektion folgendes Bild:

Das erste 24 Stunden nach der Implantation getötete Tier enthielt die implantierte Schleimlösung diffus in der Bauchhöhle verteilt, so daß die Darmschlingen und Leber und Milz mit einer großtropfigen Flüssigkeitsschicht überzogen erschienen.

Die Viskosität des Schleims (20%ige Lösung) hatte stark abgenommen, so daß seine Beschaffenheit den Eindruck einer nicht mehr als etwa 2%igen Schleimlösung machte.

Das zweite Tier der gleichen Gruppe, getötet am 5. Tage, enthielt eine geringe Menge einer serösen Flüssigkeit, die die Organe der Bauchhöhle filmartig überzog und die sich beim Eintauchen von Organproben in 5%iges Formalin weißlich trübte. Die Ursache dieser Trübung beruht wahrscheinlich in einer momentanen Fällung.

Die histologische Untersuchung ergab, daß die eindrucksvollsten Befunde bei denjenigen Tieren zu erheben waren, die ein keilförmig ausgehöltes Holunderstückchen erhalten hatten. Das liegt wahrscheinlich daran, daß in diesem Fall der Schleim leichter mit dem ihn umgebenden Gewebe reagieren kann, als wenn er in ein kanalförmig durchbohrtes Holunderröhrchen eingebracht wird.

Bei den Tieren mit den zylindrisch durchbohrten Holundermark fand sich das obere und untere Ende des Kanals von einem Zellhaufen ausgefüllt, der etwas weiter in den Kanal eindrang und der fast ausschließlich aus Leukozyten bestand. Nur vereinzelt sind histiozytäre und fibrozytäre Elemente beigemengt.

Jenseits davon fanden wir den eingebrachten Schleim. Eine Änderung seiner Beschaffenheit im Vergleich zu jener, die er vor der Implantation hatte, konnten wir nicht mit Sicherheit nachweisen. Zellige Elemente waren in ihm nur vereinzelt vorhanden, während die Außenfläche

des Holunderstückchens, die mit dem Gewebe unmittelbar in Berührung gekommen war, von einem dichten Leukozytenwall umgeben war, die auch das äußere Wabenwerk des Holunders ausfüllte, um an den Grenzen dieser wabigen, polygonalen Räume mit scharfer Linie zu enden.

Bei denjenigen Präparaten mit einem keilförmig ausgehöhlten und mit Schleim ausgefüllten Holunderstäbchen stellten wir fest, daß der implantierte Schleim allseitig von Zellen umgeben war. Wenn diese jungen Bindegewebszellen in der unmittelbaren Nähe der Schleimfäden lagen, schmiegten sie sich diesen Fasern an, so daß man den Eindruck gewinnt, sie benutzten die Schleimfasern als Leitwerk. Die außen liegenden Schichten des Schleims waren außerdem - im Gegensatz zu den zentral gelegenen Partien - aufgelockert, so daß sie unscharf in die sie umgebenden Zellmassen übergingen (Abb. 4):

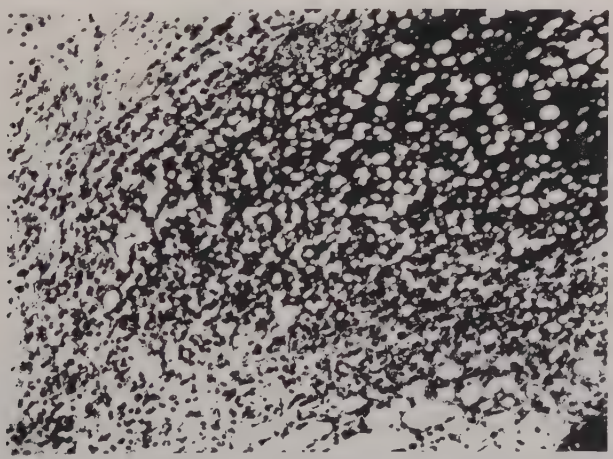


Abb. 4 Leistenbeuge der Maus 48 Std. nach Implantation von Trockenschleim. - Aufquellung von Schleim. Einwanderung von hämatogenen und histiogenen Zellen.

Diese Zellmassen nahmen, je weiter sie sich vom Schleim entfernten, das Aussehen eines jungen Bindegewebes an, dadurch daß in ihnen Fa-

sern und außerdem junge Kapillaren auftraten.
Dieses neugebildete junge mesenchymale Gewebe, das als Granulationsgewebe anzusprechen ist, nahm seinen Ausgang meist vom Fettgewebe der Umgebung.

Die Zellen dieses gewucherten Gewebes bestehen aus Histiozyten und Fibroblasten von jeweils verschiedenem Reifungsgrad. Diese Histiozyten und Fibroblasten enthielten vielfach P.A.S.-positive Granula, die sich mit Toluidin-Blau metachromatisch färbten. Die gleichen Granula lagen auch extrazellulär entlang den Ausläufern der Fibroblasten. Das Verhalten dieser extrazellulär gelegenen Granula wich von den intrazellulären insofern ab, als erstere die Speichelprobe nicht überstanden, während die P.A.S.-positive Färbbarkeit der intrazellulären Körnchen nach Speichel-Amylase-Einwirkung zwar abnahm, aber nicht schwand.

Das junge, rings um den implantierten Schleim gelegene proliferierende Gewebe war in allen Fällen auch durch die P.A.S.-Färbung rotviolett gefärbt. Diese Farbreaktion nahm vom Zentrum der ursprünglichen Schleimlagerung nach der Peripherie ab. Dieses färberische Verhalten nahm nach Speichel-Einwirkung erheblich ab, so daß schon bei Betrachtung der mit P.A.S. gefärbten Schnitte mit unbewaffnetem Auge der Unterschied der Farbintensität vor und nach Speicheleinwirkung deutlich war.

In manchen Fällen und vor allem wenn seit der Implantation bis zur Tötung der Tiere genügend Zeit verstrichen war, fanden wir nur noch Reste des implantierten Schleims im Zentrum eines dichten zell- und kapillarreichen Gewebes liegend, das in die Schleimreste unscharf überging. Es ist also zur weitgehenden Aufsaugung und Substitution des Schleimes gekommen (Abb. 5).

Unterschiede in der Gewebsreaktion bezogen auf die Konzentration des Trockenschleims in den jeweiligen Implantaten konnten nicht mit Sicherheit getroffen werden.

Abb. 5. Unterhautgewebe der Maus 7 Tage nach Implantation von Schleim mit Holundermark. Demarkierende Entzündung.

Die Reaktion des Gewebes gegenüber dem Holundermark war im allgemeinen sehr heftig und entsprach einer eitrigen Entzündung.

Die das Holundermark umgebenden Leukozyten drangen in die ihnen zugekehrten offenen Holunderwaben vor. Nach strotzender Füllung dieser Hohlräume hörte offensichtlich die weitere Emigration der Leukozyten auf.

Wenn genügend Zeit - mindestens fünf Tage - seit der Implantation verstrichen war, fand sich um das implantierte Holunderstückchen oft eine Kapsel, die aus zwei oder drei Reihen länglich gestellten, spindeligen Zellen (Fibrozyten) bestand und die den Holunder-Zylinder allseitig umschloß.

Eine solche Kapsel war indessen dort, wo Schleim allein als Implantat vorlag, nicht zu finden.

Ergebnis: Die geschilderten Befunde zeigen:

1.) daß nach parenteraler Einverleibung von Schleim eine Auflösung des Schleims erfolgt, der allem Anschein nach eine Aufquellung des Schleims vorausgehen muß;

2.) daß der Schleimauflösung eine zelluläre und gewebliche Resorption folgt. Die zelluläre Resorption fängt mit einer Leukozyten-Emigration an, die ihrerseits von einer Proliferation von Histiozyten und Fibroblasten gefolgt wird. Währenddessen entstehen junge Kapillaren, wodurch das Reaktionsprodukt das Bild eines Granulationsgewebes annimmt, das den implantierten Schleim organisiert;

3.) daß frei implantierter Schleim sich genauso wie Schleim, der zusammen mit Holundermark implantiert wird, verhält. Der Holunder verursacht eine stärkere Fremdkörperentzündung;

4.) daß schließlich der Schleim soweit aufgelöst wird, daß er färberisch nicht mehr erfaßbar ist.

C) Chemische Untersuchung [+)]

Die histologischen Befunde haben die Resorbierbarkeit von artfremdem Schleim, der in verschiedenem Zustand an verschiedenen Stellen Mäusen implantiert wurde, eindeutig erwiesen. Über das Schicksal des vor der Resorption aufgelösten Schleims ist aber nach den histologischen Bildern nichts sicheres auszusagen, man hat aber den Eindruck, daß der Schleim für die Zwecke der Resorption abgebaut wird. Wir haben deshalb versucht, die Wege des Abbaues, die offenbar der Resorption zugrunde liegen, chemisch näher zu untersuchen.

Fußend auf der Tatsache, daß das epitheliale schleimige Sekret Mucoproteide enthält, die ihrerseits Hexosamin und möglicherweise Hexuronsäuren enthalten und nach dem Studium der zu ihrem Nachweis in der Literatur angegebenen Methoden (zusammengestellt von ZACHARIAE und DYRBYE 1959), versuchten wir zunächst, den Gehalt an Uronsäure zu bestimmen durch die von DISCHE (1947) angegebene Methode in der von ihm selbst modifizierten Form (DISCHE 1950).

Diese Methode beruht darauf, daß bestimmte Gruppen des Zuckers mit Carbazol reagieren, und daß die Verbindung, die aus dieser Reaktion entsteht, eine Lichtabsorption aufweist, die bei einer Wellenlänge von 530 mμ ein deutliches Maximum besitzt (DISCHE 1947).

Die Lichtabsorption einer Lösung, die einen lichtabsorbierenden Stoff enthält, ist bekanntlich abhängig von der Konzentration des letzteren in der zu untersuchenden Lösung. Bei Messung also der Lichtabsorption dieser Lösung bei einer bekannten Wellenlänge mit Hilfe eines Spektrophotometers, und durch den Vergleich des gemessenen Wertes mit den Extinktionswerten von Lösungen, in denen die Konzentration des lichtabsorbierenden Stoffes bekannt ist, kann man die Konzentration des absorbierenden Stoffes in der Lösung quantitativ bestimmen.

[+)] Die Untersuchung wurde im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt. - Herrn Professor Dr. Herken danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten und Herrn Priv. Doz. Dr. Koransky für die hilfsbereite Unterstützung und Anregung.

Wir haben zuerst eine Eichlösung (Tab. 5) mit Glucuronsäurelacton als Substrat hergestellt, indem wir 8,8 mg Glucuronsäurelacton (MERCK) in 50 ml Wasser gelöst haben. Das Mol-Gewicht von Glucuronsäurelacton ist 176. Unsere Eichlösung enthielt also 1 Mol/cm^3 bzw. 0,176 mg/cm^3. Zur Messung des vermuteten Uronsäuregehaltes im Schleim stellten wir eine Trockenschleimlösung her, indem wir 50 mg Trockenschleim in 5 ml aqua dest. mit Hilfe eines Magnetrührers lösten. Um ein homogenes Wasser-Schleimgemisch zu erhalten, mußte über mindestens 12 Stunden durch den Magnetrührer bei mittlerer Tourenzahl durchmischt werden.

Mit dieser Trockenschleimlösung wurden vier Reagenzgläser mit je 0,1 ml (Gläser I, II, III, IV) und vier (V, VI, VII, VIII) mit je 0,5 ml beschickt. Den Gläsern mit 0,1 ml Substrat wurde ad 0,5 ml Wasser zugefügt. Alle Gläser wurden anschließend in Eiswasser abgekühlt, dann wurde jedem Glas 3 ml konz. H_2SO_4 zugefügt.

Das so hergestellte Gemisch wurde, nachdem es für 3 min in Leitungswasser von Zimmertemperatur gebracht war, für 90 sec in ein Wasserbad von 60°C getaucht. Ein am Reagenzglashalter angebrachtes Zwischenblech diente als Deckel für das Wasserbad und verhinderte, daß sich an der Innenwand des Reagenzglases Wasserdampf kondensierte, wodurch die Schwefelsäurekonzentration verändert werden konnte. Danach wurden die Reagenzgläser durch Eintauchen in Eiswasser abgekühlt und der Inhalt mit 0,1 ml einer 0,1%igen alkoholischen Carbazol-Lösung (MERCK) versetzt.

Es zeigte sich, daß das zu untersuchende Substrat nach der Erhitzung im Wasserbad eine Braunfärbung annahm, die sich nach der Carbazolzugabe verstärkte.

Die Messung der Lichtabsorption des zu untersuchenden Substrates wurde an einem Beckman-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 530 mμ etwa zwei Stunden nach der Carbazolzugabe vorgenommen. Die Ergebnisse der Messung sind in der Tabelle 6 dargestellt. - Die Tabelle 5 gibt die mit dem Glucuronsäurelacton hergestellte Eichkurve wieder.

Tabelle 5

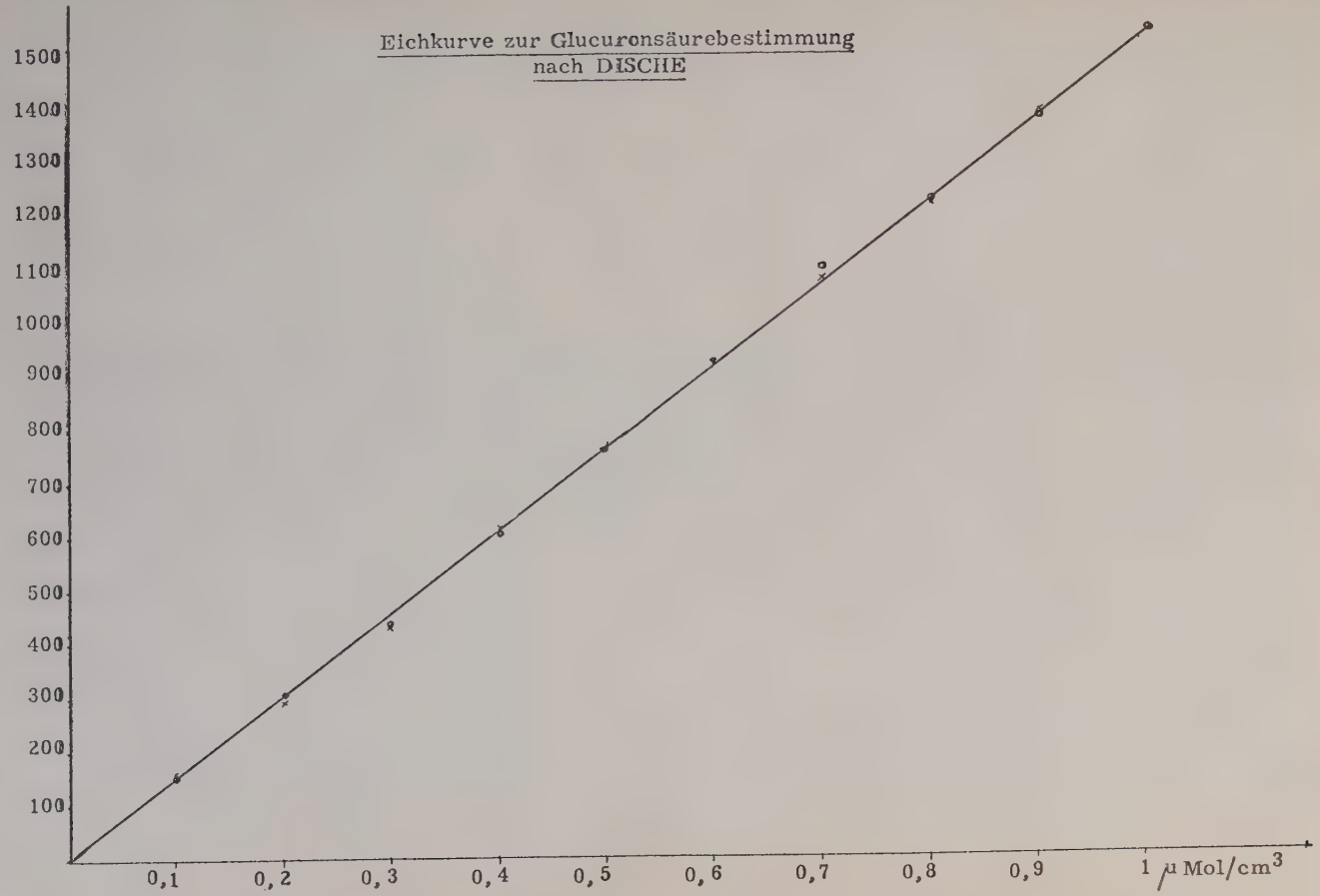
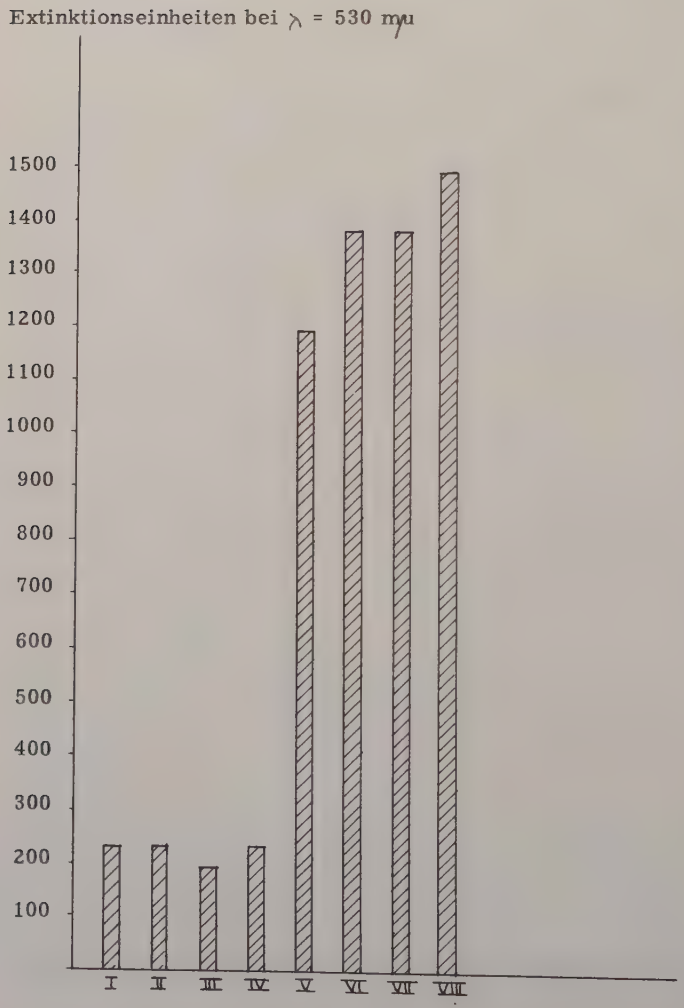

Extinktionseinheiten bei λ = 530 mμ
Eichkurve zur Glucuronsäurebestimmung
nach DISCHE
1500
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1 μ Mol/cm3

Tabelle 6

Hexuronsäure-Bestimmung im Schleim nach DISCHE

I - IV: Proben 0,0285 mg Trockenschleim/ml Meßlösung enthaltend

V - VIII: Proben 0,1425 mg Trockenschleim/ml Meßlösung enthaltend.



Es ist darauf hinzuweisen, daß die sonst zu erwartende purpurrote Farbe in unserer Trockenschleimlösung nach der Carbazolzugabe nicht eintrat, und es wurde somit die Lichtabsorption der nach der H_2SO_4-Zugabe eingetretene und bei der Carbazolzugabe verstärkten Braun Färbung gemessen.

Da die Ergebnisse der eben beschriebenen Untersuchung nicht befriedigten, entschlossen wir uns, im Schleim nach Hexosamin zu fahnden und bedienten uns dabei der Methode von ELSON-MORGAN (1933). Die Methode beruht auf der Beobachtung, daß, wenn Glucosaminhydrochlorid in einer alkalischen Lösung mit Acetylazeton gekocht wird, das Reaktionsprodukt mit Ehrlich's Reagenz bei gleichzeitiger Anwesenheit von Alkohol eine stabile rote Farbe gibt (Ebenda).

Die Errechnung der Konzentration einer Lösung an Glucosaminhydrochlorid bzw. Hexosamin geschieht spektrophotometrisch wie die Bestimmung der Uronsäure mit der DISCHE-Methode.

Vor der Hexosamin-Bestimmung muß das Hexosamin aus dem Muco-proteid, dessen eine Komponente es ausmacht, durch Säure-Hydrolyse befreit werden.

Die Mehrzahl der Autoren (WERNER 1953, BOAS 1953 u. a.) ist sich einig in dem Punkt, daß beim Kochen des das Hexosamin enthaltenden Substrates in 2-n Salzsäure für ca. 15 Stunden die besten Ergebnisse zu erzielen sind dadurch, daß dabei eine maximale Ausbeute an Hexosamin erfolgt unter gleichzeitiger Zerstörung der in dem Substrat enthaltenen Monosaccharide und Aminosäuren, die die Farbreaktion stören würden.

ELSON - MORGAN (1933) geben an, daß die zu messende Probe (1-2ml) 0,5 bis 3,0 mg Hexosamin enthalten soll. Nach BOAS (1953) soll die zu messende Probe (1-2 ml) etwa 0,030 bis 0,30 mg Hexosamin enthalten.

Nach WERNER (1953) weist der epitheliale Schleim 17,8 % Hexosamin auf.

Auf Grund dieser Angaben haben wir 50 mg Trockenschleim hydrolisiert und den Hydrolysenrückstand ad 25 ml mit aqua dest. aufgefüllt. Diese Lösung enthielt 2 mg/ml Trockenschleim-Hydrolysat bzw. - bei einem Hexosamingehalt im Schleim von etwa 20 % - 0,4 mg Hexosamin pro Milliliter.

Die Hydrolyse der 50 mg von Trockenschleim haben wir mit 2 ml einer 2 n-HCl-Lösung durchgeführt (diese Salzsäuremenge reicht zur Hydrolisierung von 50 mg Trockenschleim vollkommen aus), indem wir den pulverisierten Schleim zusammen mit der Salzsäure in ein Zentrifugenglas gebracht und das mit einem Glasstopfen versehene Glas in ein kochendes Wasserbad für 15 Std. getaucht haben, so daß der Wasserspiegel des Wasserbades etwa 3 - 5 cm über dem Flüssigkeitsspiegel im Zentrifugenglas sich befand.

Nach Beendigung der Hydrolyse wurde die im Zentrifugenglas enthaltene HCl mit Hilfe einer Kapillarröhre, an die eine Wasserstrahlpumpe durch ein T-Glas angeschlossen war, abgedampft. Während der Abdampfung tauchten wir das das Hydrolysat enthaltende Zentrifugenglas in ein Wasserbad bei einer Temperatur von 40 - 60° C.

Dem Rückstand wurden etwa 5 ml aqua dest. zugesetzt, das Wasser wurde, wie oben angegeben, wieder abgedampft. Diese Wäsche wurde zur Entfernung der HCl-Reste einige Male wiederholt. Der Rückstand wurde schließlich in 10 ml aqua dest. aufgefangen und 15 min bei etwa 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Dann wurde der vom Rückstand befreite Inhalt vorsichtig ausgekippt und ad 25 ml mit aqua dest. aufgefüllt.

Mit dieser Lösung (2 mg Trockenschleim-Hydrolysat pro Milliliter enthaltend) wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt bestehend aus 2 mal 6 Röhrchen die jeweils um 0,1 ml steigend mit 0,1 - 0,6 ml beschickt sind.
Die Röhrchen wurden danach mit aqua dest. ad 1,5 ml aufgefüllt.

Im Anschluß daran setzten wir 0,5 ml einer Acetylaceton-Lösung zu, die folgendermaßen angesetzt wurde: 1 cm^3 Acetylaceton wurde in eine Natriumcarbonat-Lösung ($Na_2CO_3 \cdot 10\ H_2O$) pipettiert, bereitet aus 7,19 g Na_2CO_3) p.a.), in 50 ml H_2O gelöst (das ergibt 0,5 N Natriumcarbonat-Lösung). Das Gemisch wurde für 15 min in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Die Wasseroberfläche stand gerade etwas oberhalb des Flüssigkeitsspiegels in den Reagenzgläsern, während die oberen Teile der Reagenzgläser über das Wasserbad hinausragten, damit Acetylaceton-Verluste vermieden wurden, die durch dessen Abdampfung hätten eintreten können. Ein Zwischenblech diente als Deckel und verhinderte, daß sich Wasserdampf an der Innenwand der Reagenzgläser kondensierte.

Nach der Erhitzung wurde das Gemisch für 3 min in Eiswasser abgekühlt und je 2,5 ml Aethanol in jedes Reagenzglas pipettiert.

Zuletzt erfolgte die Zugabe von EHRLICHs Reagenz (0,8 g p-Dimethylaminobenzaldehyd MERCK gelöst in 30 cm^3 Alkohol + 30 cm^3 konz. HCl) in einer Menge von 0,5 ml pro Reagenzglas.

Eine purpurrote Farbe entwickelte sich gleich danach, die ihr Intensitäts-Maximum nach ca. 20 min erreichte.

Die Lichtabsorption wurde in einem Beckmann-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 540 mμ gemessen, jeweils ca. 20 min nach Zugabe des EHRLICH-Reagenzes.

Die Wellenlänge 540 mμ, bei der das Maximum an Absorption erfolgte, wurde bestimmt, indem Licht verschiedener Wellenlänge mit Hilfes eines registrierenden Spektrophotometers durch eine bekannte Eichprobe hindurchgeschickt und die Wellenlänge, bei der die maximale Lichtabsorption erfolgte, festgehalten wurde. (Tab. 7).

Für die Eichreihe wurde eine 0,1 mg/ml enthaltende Glucosaminhydrochlorid-Lösung MERCK hergestellt. Mit dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe bereitet, wie sie in der Tabelle 8 wiedergegeben wird.

Die Leerwerte für die Eichreihe wurden hergestellt, indem wir die Lichtabsorption von Proben gemessen haben, die statt Glucosaminhy-

Tabelle 7

Extinktion einer 13,3 γ Glucosaminhydrochlorid/ml enthaltenden Lösung bei veränderlichen Wellenlängen (Ordinate)

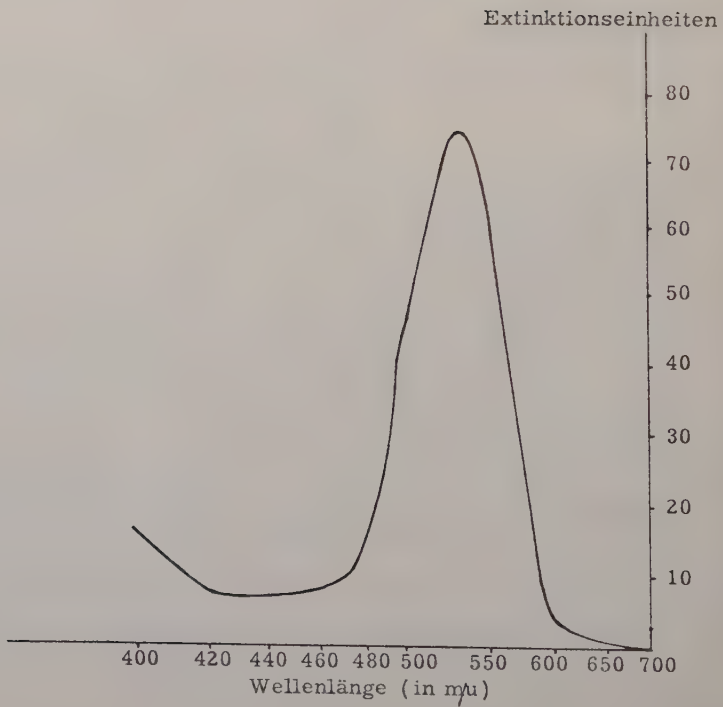
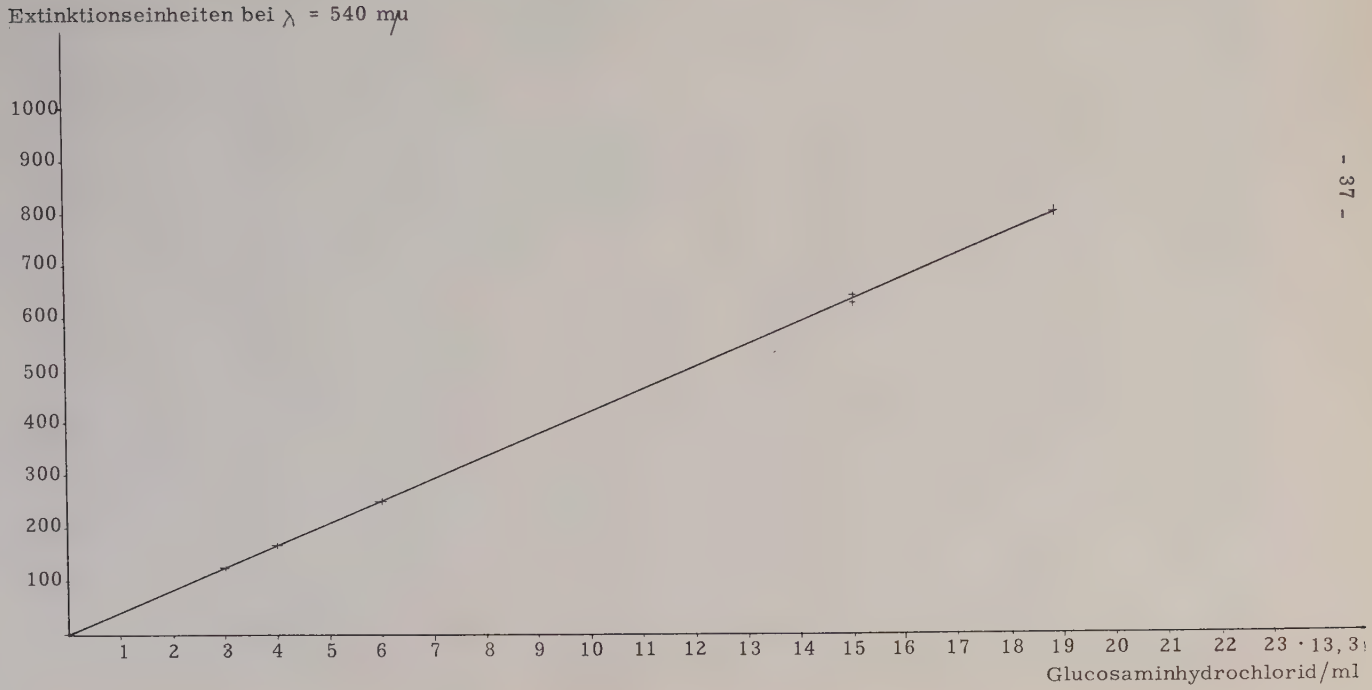


Tabelle 8

Eichkurve zur Glucosaminbestimmung
nach ELSON-MORGAN



drochlorid nur Wasser enthielten und indem wir Glucosaminhydrochlorid-Lösungen statt mit 0,5 ml EHRLICHs Reagenz mit 0,5 ml eines Gemisches aus gleichen Teilen Alkohol und konz. Salzsäure beschickten.

Diese Messungen mit dem "falschen" EHRLICHs Reagenz erlaubten den Gehalt der zu messenden Probe an unspezifischen lichtabsorbierenden Substanzen festzustellen, die jedoch nicht mit dem p-Dimethylaminobenzaldehyd reagierten und somit kein Hexosamin waren.

Die Lichtabsorption solcher Leerwerte haben wir auch immer bei allen Schleim enthaltenen Lösungen gemessen und von dem Wert abgezogen, den die Messungen der mit p-Dimethylaminobenzaldehyd beschickten entsprechenden Proben ergaben. Der nach dieser Subtraktion erhaltene Wert entsprach dem Wert der Lichtabsorption, die spezifisch durch Hexosamin verursacht war.

Tab. 8 stellt die Eichreihe mit Glucosaminhydrochlorid und Tab. 9 die Extinktion, die bei 0,4 mg Trockenschleimhydrolysat/ml enthaltenden Lösungen gemessen wurde, dar. Der Hexosamingehalt des Schleims macht diesen Messungen gemäß etwa 12% des Trockengewichts aus.

Anschließend wurde ein Versuch angestellt, indem verschiedene Mengen einer Trockenschleimlösung mit verschiedenen Mengen von Rattenserum für verschiedene Zeiträume im Brutschrank bei einer bestimmten Temperatur inkubiert wurden.

Unmittelbar vor diesem Serum-Vorversuch wurden Teile des Trockenschleims auf Kulturböden geimpft und auf bakterielle Verunreinigungen untersucht:

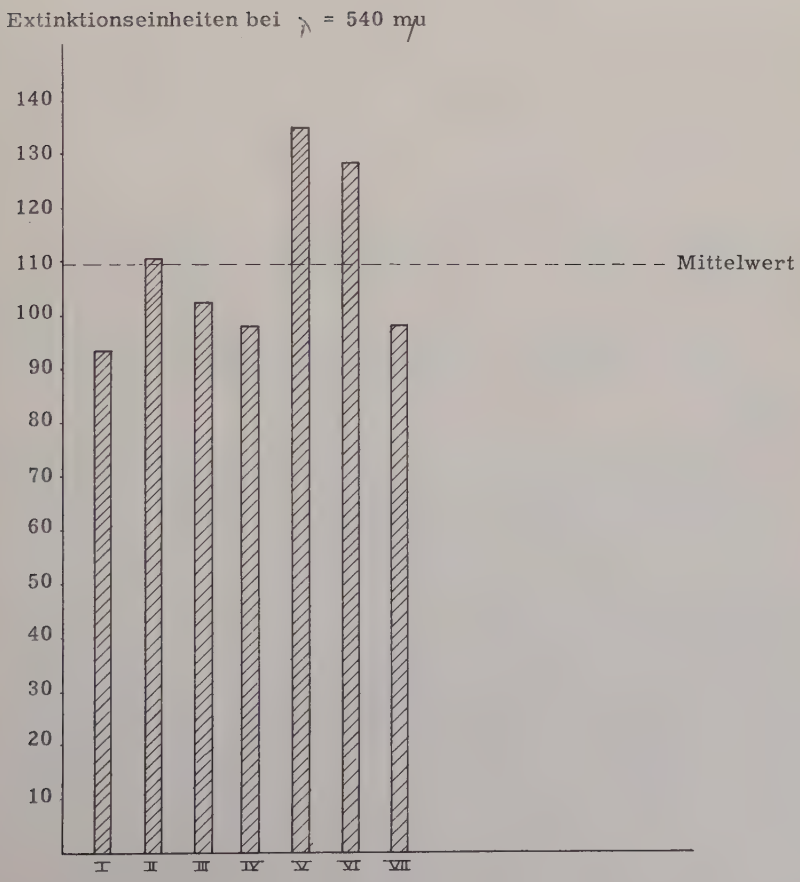
Die Untersuchung ergab:

1. im Direkt Präparat: vereinzelte Gram-post. Kokken
2. Placenta Bouillon (Wachstum nach 72 Std.) auf der Blutplatte: Weiße, nicht-hämolysierende, nicht Hyaluronidase-bildende Staphylokokken.

Tabelle 9

Hexosamingehalt des Schleims

I - VII: Meßproben 0,4 mg Trockenschleim-hydrolysat/ml enthaltend



3. Traubenzucker-Bouillon (Wachstum nach 24 Std.):
leicht hämolysierende Streptokokken (nicht A-Streptokokken; keine Enterokokken); keine Hyaluronidasebildende Bakterien.

Um die Wirkung dieser Bakterien-Flora zu unterdrücken, die den Versuch hätten stören können, fügten wir Terramycin (LEDERLE) den (untenstehenden) Gemischen zu.

Durch diesen Versuch wollten wir feststellen, ob eine Eliminierung im Schleim befindlichen Hexosamins durch Einwirkung der Fermente im Rattenserum während einer Inkubation stattfindet, was auf eine Befreiung des Hexosamins aus dem Mucoproteid hinweisen würde.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen: 125 mg Trockenschleim wurden mit 1,25 ml aqua dest. versetzt. Da der Schleim sich nicht gut löste, wurden weitere 10 ml Wasser zugeführt (die Lösung enthält also ca. 1% Trockenschleim).

Rattenserum wurde von erwachsenen Ratten nach Dekapitation und anschließendem Ausbluten in weithalsigen Zentrifugengläsern gesammelt. Das so gewonnene Blut wurde etwa 24 Stud. im Eisschrank bei 4°C stehen gelassen. Dann wurde das Serum ausgekippt und vorsichtig in Zentrifugengläser geschüttet, danach etwa 15 min bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert.

Das so gereinigte Serum wurde in Erlenmeyer-Kolben gesammelt. Rötlich gefärbtes Serum wurde nicht verwendet, da es eine Hämolyse bedeutet und der Übergang der Erythrozyten-Fermente in das Serum die Richtigkeit der Ergebnisse in Frage gestellt hätte.

Es wurden drei Versuchsreihen angestellt:
a) Zwei Zentrifugengläser wurden mit je 0,8 ml der 1%igen Trockenschleimlösung, 0,1 ml Terramycinlösung (bereitet durch Lösen von 1 mg Terramycin (LEDERLE) in 10 ml aqua dest.) und 0,1 ml unverdünntem Rattenserum beschickt.

b) Zwei weitere Zentrifugengläser wurden mit je 0,1 ml der gleichen Trockenschleimlösung, 0,1 ml Terramycinlösung und 0,8 ml Rattenserum beschickt. Die vier Röhrchen wurden, nach guter Durchmischung durch einen Glasstab, in einen Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C gestellt.

Es ist auch hier zu bemerken, daß es schwierig war, ein homogenes Serum-Schleim-Gemisch zu erhalten. Der Schleim lag auch nach der Inkubation in Form von bis mittelfeinen Flocken im Serum (das in diesem Fall als Lösungsmittel diente), vor.
Je ein Zentrifugenglas der Reihe a) und b) wurden aus dem Brutschrank nach 8 Stunden, die beiden anderen nach 24 Stunden genommen und für 2 min in ein Wasserbad von 100°C getaucht, um die im Serum-Schleim-Gemisch befindlichen Mucoproteide zu denaturieren bzw. zu fällen.

Anschließend wurden die wie oben behandelten Serum-Schleim-Gemische mit aqua dest. ad 10 ml aufgefüllt und bei ca. 3000 Umdrehungen für 15 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugierung wurde die über den Schleim stehende Flüssigkeit abgegossen, damit das evtl. vom Schleim befreite Hexosamin entfernt wird. Die jetzt nur Schleim bzw. Mucoproteide enthaltenden Zentrifugengläser wurden sofort mit 10 ml einer 2 n-HCl beschickt, mit einem Glasstopfen versehen und in ein kochendes Wasserbad für 15 Stunden gestellt. Außerdem wurden noch zur Kontrolle zwei Gemische (eines wie unter a), eines wie unter b)) bereitet und genau wie die obigen behandelt, bis auf die Inkubation im Brutschrank. Dieser Versuch wurde 3 mal durchgeführt.

Nach der Hydrolyse haben wir die HCl (wie oben beschrieben) abgedampft, den Rückstand 3-4 mal mit aqua dest. gewaschen und in jeweils 10 ml aqua dest. aufgefangen. Es folgte Zentrifugierung (15 min bei 3000 Umdrehungen/min); der Gläserinhalt wurde vorsichtig in sauberen Erlenmayer-Kolben gesammelt.

Von jedem Erlenmeyer-Kolben wurden 1,5 ml zur Hexosamin-Bestimmung entnommen. Die Bestimmung erfolgte in oben beschriebener Weise. Bei jeder Messung wurden Eichproben von Glucosaminhydrochlorid herangezogen.

Die gemessenen Extinktionen bei 540 mμ (nach Abzug des nur Alkohol und Salzsäure ohne p-Dimethylaminobenzaldehyd enthaltenden Leerwertes) sind in der Tabelle 10 eingetragen. Eine Probe, die in der Tabelle fehlt, ist bei der Zentrifugierung ausgeschüttet worden.

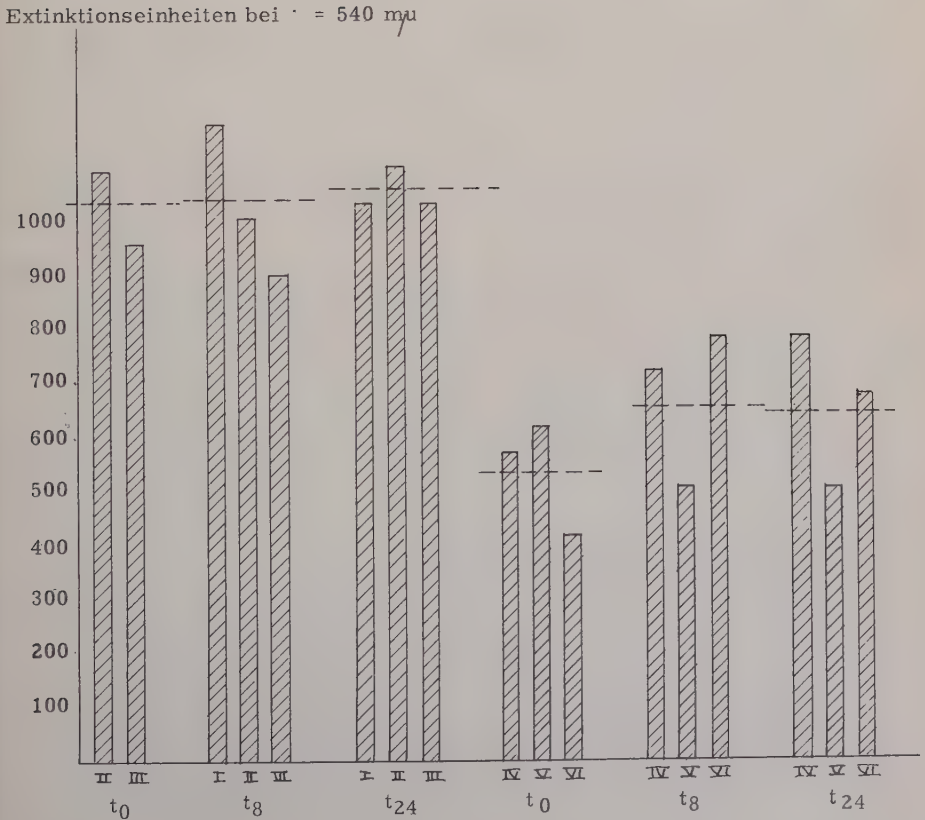
Es ist zu bemerken, daß die Leerwerte, die jeweils vom Vollwert abgezogen wurden, sehr hoch waren, was auf einen hohen Gehalt der Proben an unspezifischen die Farbreaktion störenden Stoffen hinweist.

Tabelle 10

Extinktionswerte von hydrolysierten Schleimlösungen nach Inkubation mit Rattenserum und Terramycin.
Inkubationsdauer: 0, 8 und 24 Stunden.

I, II, III: Lösungsproben mit je 0,24 mg Trockenschleim, 0,03 ml Rattenserum und 0,3 Terramycinpulver UEDERLE pro ml.

IV, V, VI: Lösungsproben mit je 0,24 ml Rattenserum, 0,03 mg Trockenschleim und 0,3 Terramycin pro ml.



Versuch intraperitonealer Einbringung von Schleim.

In Anschluß an diese Versuchsreihe wurden vier männliche Albino-Ratten (Gewicht 120 - 150 g) mit 4 ml einer ca. 0,5%igen Trockenschleimlösung beimpft. Die Verabreichung des Materials erfolgte in die Bauchhöhle mit Hilfe einer Injektionsspritze.

48 Stunden nach Verabreichung des Schleims wurden alle vier Tiere dekapitiert. Der Bauchhöhleninhalt wurde aus zwei kleinen Öffnungen im Peritoneum mit 35 cm^3 lauwarmem aqua dest. gespült. Die Spülflüssigkeit wurde in Kristallisationsschalen gesammelt und über Nacht in einen Vakuumexsikkator gebracht.

Den trockenen Rückstand haben wir anschließend nach der beschriebenen Art einer Hydrolyse unterworfen. Das Hydrolysat wurde in jeweils 10 ml aqua dest. aufgefangen. Davon sind 1,5 ml für die Analyse entnommen worden.

Die Ergebnisse der Analyse wie auch die Höhe der Extinktion des in der implantierten Flüssigkeit vorhandenen Hexosamins sind aus der Tabelle 11 ersichtlich.

Bei der Messung fanden wir sehr hohe Leerwerte (Spülflüssigkeits-Hydrolysatproben, die mit einem HCl-Alkohol Gemisch beschickt waren), die auf einen großen Gehalt der Proben an unspefischen Beimengungen hinwiesen und die Methode dieser intraperitonealen Schleimeinbringung mit anschließender Analyse der Bauchspülflüssigkeit kaum verwertbar machten.

Versuch in SELYEscher Lufttasche.

Angesichts dieser Umstände wurde versucht, die Granulom-Taschen-Methode nach SELYE für unsere Zwecke auszuprobieren. (1953).

Dabei wird mit einer feinen Injektionsnadel Luft (20 cm^3) unter die Rückenhaut einer Ratte gespritzt und anschließend durch die gleiche Kanüle die zu untersuchende Substanz in die entstandene "Lufttasche"

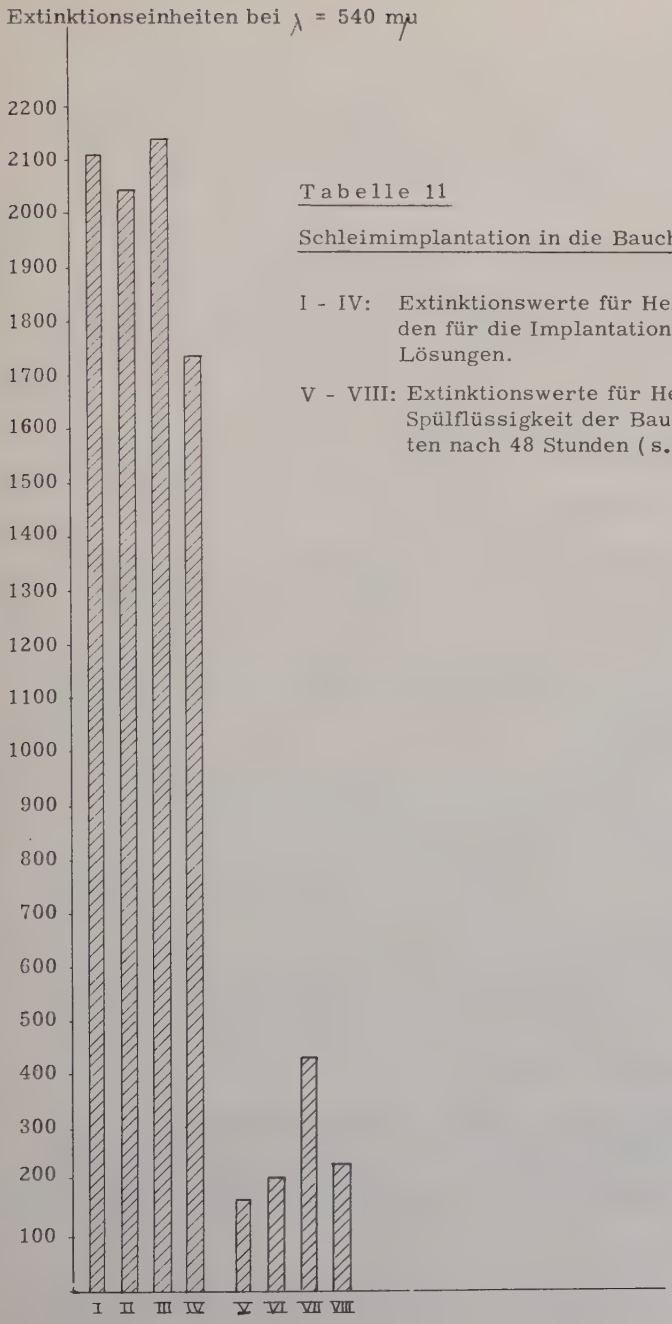


Tabelle 11

Schleimimplantation in die Bauchhöhle von Ratten

I - IV: Extinktionswerte für Hexosamin in den für die Implantation verwendeten Lösungen.

V - VIII: Extinktionswerte für Hexosamin in der Spülflüssigkeit der Bauchhöhle der Ratten nach 48 Stunden (s. auch Text)

hineingebracht. (SELYE benutzte diese Methode, um die Entzündungsvorgänge an dem diese Lufttasche umgebenden Gewebe zu studieren, nach Einspritzung von verschiedenen Reizflüssigkeiten (z.B. Krotonöl) in die Luftblase unter gleichzeitiger Behandlung der Tiere mit Cortison.)

Nach etwa 7 Tagen bildete sich um die Luftblase ein Granulationsgewebe, das die Blase allseitig umschloß, so daß sie in toto exstirpiert und ihr Inhalt chemisch untersucht werden konnte, während ihre aus Granulationsgewebe bestehende Wand einer histologischen Untersuchung bequem zugänglich war.

Wir haben männliche Albino-Ratten von 120 - 150 g Gewicht benutzt.

Mehrere Versuchsreihen wurden folgendermaßen angesetzt:

In kurzer Äthernarkose spritzten wir den Tieren 20 cm^3 Luft ein, indem wir die Haut des Rückens quer zur Wirbelsäule leicht anhoben und die Nadel über der Wirbelsäule, unmittelbar unter die Haut einstachen. Anschließend verabreichten wir durch die gleiche im Tier belassene Kanüle in die erzeugte Luftblase 4 cm^3 einer 0,5 - 0,6%igen Trockenschleimlösung.

Zur Kontrolle erhielten außerdem Tiere statt 4 ml Trockenschleimlösung 4 ml aqua dest. unter sonst gleichen Bedingungen.

Die Tiere wurden am vierten bzw. achten Tag nach dieser Behandlung durch Chloroforminhalation getötet. Die Haut des Rückens wurde so abpräpariert, daß die Granulom-Tasche nur an ihrer Unterlage haftend zu Gesicht kam. Dann wurde an dem Scheitel der Cyste mit einer feinen Injektionskanüle eingegangen und in die Granulom-Tasche 2 ml lauwarmes aqua dest. eingeführt.

Unter Belassung der Nadel wurde der jetzt flüssige Inhalt der Cyste 5 min durch zarte Massage von außen hin und hergeschwenkt und durch die Kanüle mit Hilfe einer Spritze abgesaugt, indem wir den Operations-

tisch, auf dem das Versuchstier befestigt war, auf die Seite kippten, so daß die Flüssigkeit in der Cyste an einer Seite sich ansammelte und durch die Kanüle abgesaugt werden konnte.

Diese Spülung mit je 2 ml aqua dest. führten wir fünfmal bei jedem Versuchstier durch.

Das Spülwasser haben wir anschließend in Kristallisierschalen gesammelt und diese in einen Vakuumexsikkator gestellt, dessen Boden mit einer NaOH-Schicht von ca. 2 cm bedeckt war.

Die Granulomtaschen wurden von ihrer Unterlage vorsichtig abpräpariert und nach breiter Eröffnung durch einen Scherenschnitt in 5%iger Formalinlösung zur Fixation gebracht.

Nach Trocknung des Inhalts der Kristallisierschalen im Vakuumexsikkator haben wir ihn mit 5 bis 10 ml 2 N HCl-Lösung gespült und bei 100° C 15 Stunden lang hydrolisiert.

Die HCl wurde anschließend abgedampft und der Rückstand nach mehrmaligem Waschen mit aqua dest. in 10 ml Wasser aufgefangen und abzentrifugiert. Von dieser Lösung wurden jeweils 1,5 ml zur Analyse entnommen. Die Meßergebnisse sind in der Tabelle 12 eingetragen.

Bei jeder Analyse ist die Lichtabsorption (bei 540 mμ) auch von Glucosaminhydrochloridproben und von Hydrolysat-Lösungen von Trockenschleim zur Kontrolle gemessen worden.

Es ist wichtig, darauf hinzuweisen, daß bei der Eröffnung der SELYE-Taschen vier bzw. acht Tage nach deren Erzeugung nirgends auch nur Spuren der eingespritzten Schleimlösung zu finden waren.

Sowohl bei den mit Schleimlösung gefüllten Taschen als auch bei denen nur Wasser gefüllten sah die Cysten-Innenwand glänzend-feucht aus. Die eingespritzte Flüssigkeit - sei es Schleimlösung oder aqua dest. - war nicht mehr vorhanden.

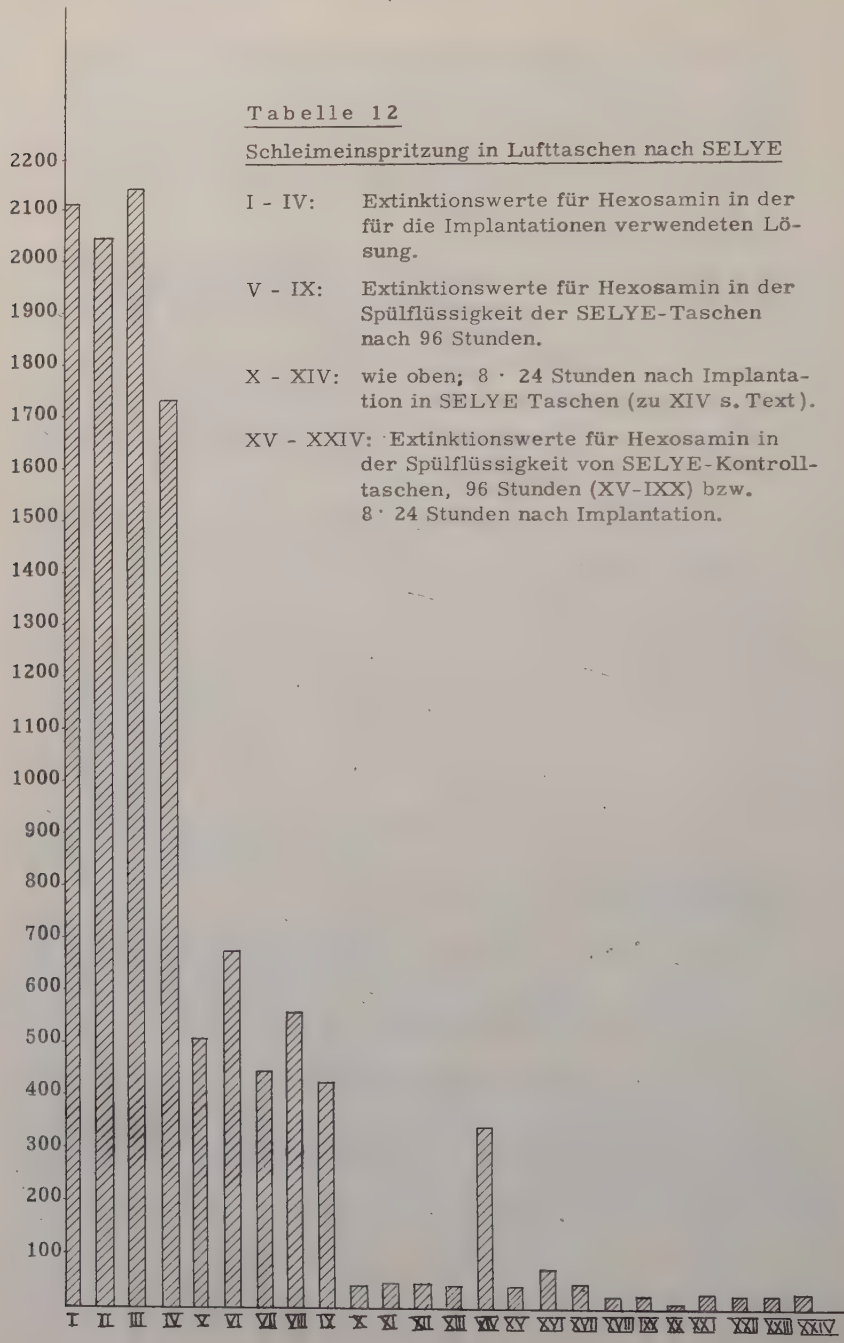


Tabelle 12

Schleimeinspritzung in Lufttaschen nach SELYE

I - IV: Extinktionswerte für Hexosamin in der für die Implantationen verwendeten Lösung.

V - IX: Extinktionswerte für Hexosamin in der Spülflüssigkeit der SELYE-Taschen nach 96 Stunden.

X - XIV: wie oben; 8 · 24 Stunden nach Implantation in SELYE Taschen (zu XIV s. Text).

XV - XXIV: Extinktionswerte für Hexosamin in der Spülflüssigkeit von SELYE-Kontrolltaschen, 96 Stunden (XV-IXX) bzw. 8 · 24 Stunden nach Implantation.

Nur bei einem Tier (Tier XIV, Tab. 12), dem aus Versehen weniger Luft (ca. 5- statt 20 cm^3) unter die Haut gespritzt worden war, fand sich acht Tage nach der Implantation in der Granulom-Tasche eine nicht geringe Menge eines schleimigen Materials. Die Analyse dieses Cysten-Inhaltes ergab, daß die Cyste ein Vielfaches an Hexosamin enthielt im Vergleich zu den übrigen Tieren dieser gleichen Versuchsreihe.

Bei der histologischen Untersuchung der Wände der Granulom-Taschen zeigte sich, daß deutliche Unterschiede bestanden zwischen den Cysten, die nur mit Wasser und denen, die Trockenschleimlösung enthalten hatten (Abb. 6a und 6b).

Grundsätzlich fand sich bei beiden Cysten-Arten zuinnerst eine Schicht von gewucherten Zellen, die nach außen in eine Schicht von lockerem Bindegewebe überging, das sich seinerseits an Fett und/oder Muskelbindegewebe anschloß.

Bei den wassergefüllten Cysten (s. Abb. 6a) war die an den Hohlraum grenzende Zellschicht meist niedrig, glatt, aus einer bis zwei Reihen von Zellen bestehend. Die Zellen dieser Schicht waren rund oder gestreckt, sie entsprachen Histio- oder Fibrozyten, die z. T. endothelartig transformiert sind. Das darunterliegende Bindegewebe bestand aus sehr locker gewobenen Bindegewebsfibrillen mit dazwischen liegenden größeren Bindegewebszellen.

Die Wand der schleimgefüllten Taschen (s. Abb. 6b) zeigte eine wesentlich breitere und zellreichere Innenschicht, war außerdem nur zum Teil glatt und ragte in den Hohlraum manchmal pilzförmig oder handschuhfingerartig vor.

Die Zellreihen, die die Taschenwand nach dem Hohlraum begrenzten, waren meistens auffallend unregelmäßig gestaltet. Die Zellen liegen z. T. locker und anscheinend ohne Zusammenhang, sind netzartig

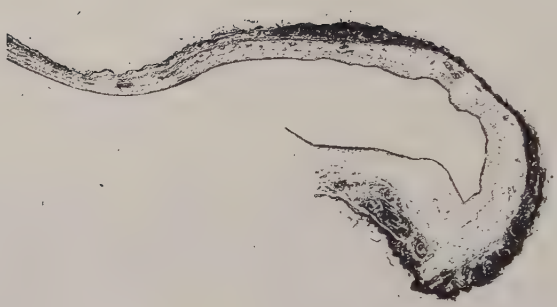


Abb. 6a) Wand einer mit Wasser gefüllten SELYE-Tasche (Kontrolle).

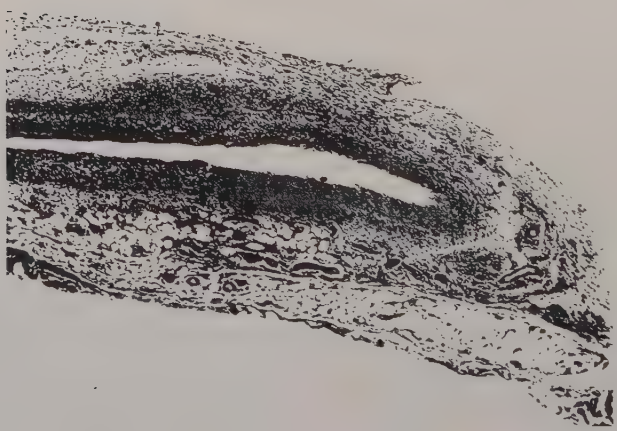


Abb. 6b) Wand einer mit Schleimlösung gefüllten SELYE-Tasche. Breite Reaktionszone.

verzweigt und in den oberflächlichen Lagen ragen sie teilweise frei in das Innere, so daß bei oberflächlicher Betrachtung der Eindruck entsteht, daß gar kein Zusammenhang mit den übrigen Zellen dieser Schicht besteht, während in Wirklichkeit doch zarte Verbindungen zu den anderen Zellen vorliegen. Diese Zellen stellen Histiocyten und junge faserbildende Bindegewebszellen dar. Die breite und zellreiche, ein Granulationsgewebe verkörpernde Innenschicht der schleimhaltigen Beutelwand ist, - im Vergleich zu den wasserhaltigen Beuteln - offensichtlich Folge einer stärkeren Resorptionsleistung, wobei die Resorption anscheinend nur durch Zellen vermittelt werden kann.

Nach außen setzt sich die Granulationsschicht mit meist unscharfer Linie in ein dichteres faserreicheres junges Bindegewebe mit runden oder ovalen Zellen ohne Beimengung von freien Rundzellen. Neben den Zellen und den Fibrillen enthält diese Gewebsschicht zahlreiche Kapillargefäße.

Der relative Faserreichtum dieses Gewebes wie auch die Tatsache, daß mehr Fibrozyten als Fibroblasten vorhanden sind, veranlaßte uns, ein älteres und hinsichtlich seiner resorptiven Fähigkeit inaktives Gewebe anzunehmen.

Der Zeitraum, in dem die beschriebenen SELYE-Taschen entstanden sind, betrug für beide Versuchsreihen 8 Tage.

Diskussion der Ergebnisse

Die Mehrzahl der Autoren, die in der Einleitung erwähnt wurden, haben die Reaktion des Gewebes, wenn es mit nicht orthologisch entstandenen Schleimsubstanzen in Berührung kommt, als Fremdkörperreaktion interpretiert.

Wir haben festgestellt, daß Fremdschleim - in unserem Falle Zervikalschleim von Kühen - nach Implantation subcutan oder intraperitoneal bei Mäusen zuerst eine Quellung erfährt, die, wie makroskopisch und mikroskopisch feststellbar, von den Rändern ausgehend nach dem Zentrum fortschreitet mit dem Ergebnis, daß die Viskosität der jeweils verwendeten Trockenschleimlösung in der gleichen Richtung abnimmt.

Diese Verflüssigung geht langsam vor sich, sie beruht offenbar auf einem Einstrom von Flüssigkeit aus dem umgebenden Gewebe, wobei es sich wohl um ein entzündliches Produkt auf das körperfremde Material handelt. (In vitro setzt der Schleim dem Versuch, seine Viskosität herabzusetzen, großen Widerstand entgegen; die Schwerlöslichkeit des Schleims beruht allem Anschein nach aus der makromolekularen Struktur der in ihm enthaltenen Mucoproteiden).

Dieser ersten Reaktion seitens des Gewebes, die einer serösen Exsudation bzw. serösen Entzündung durchaus entspricht, folgt eine Zellproliferation, die bei subcutaner Applikation meist von dem Fettgewebe ihren Ausgang nimmt. Diese aus Histiozyten und Fibroblasten bestehende Zellproliferation ist als eine Fremdkörperreaktion aufzufassen und als Versuch neben der azellulär vermittelten Verflüssigung des Schleims mit Hilfe von Zellen das Fremdmaterial abzubauen und zu beseitigen.

Im weiteren Verlauf konnten wir beobachten, daß der implantierte Schleim allmählich verschwindet, während der von ihm eingenommene Raum allmählich von einem zunehmend ausreifenden Bindegewebe ausgefüllt wird, das unseres Erachtens den Endzustand der vom Schleim induzierten Zellproliferation darstellt und einem Organisationsprodukt entspricht.

Der mit dem Rattenserum angestellte Versuch hat gezeigt, daß das Serum den Schleim in kleinere Bruchstücke nicht spaltet bzw. daß es kein Hexosamin in Freiheit setzt. Es ist somit nicht zu erwarten, daß etwa einfaches Bluttransudat den Schleim in kleinere Bestandteile zerlegt.

Die im normalen Serum vorkommenden Fermente dürften sowohl quantitativ als auch qualitativ verschieden sein von denjenigen, die in einem entzündlichen Exsudat auftreten können. Dennoch möchten wir annehmen, daß auch die Wirkung des serösen Exsudats allein nicht genügt, um ins Gewebe ergossenen Schleim zum Verschwinden zu bringen, d.h. zu resorbieren.

Wie die Komponenten Zellen und Flüssigkeit im einzelnen auf den Schleim wirken, können wir nicht exakt entscheiden; dies gilt insbesondere für die Frage, ob das Exsudat außer dem physikalischen Effekt der Aufquellung noch weitere Eigenschaften entfaltet. Daß die wuchernden Bindegewebszellen den Schleim fermentativ angehen, dürfte sicher sein, denn anders wäre ein Verschwinden nicht erklärbar. Hierbei geht es allerdings um die Frage, wieweit die fermentative Beeinflussung geht, ob der Abbau extra- oder intrazellulär erfolgt.

Es fanden sich zwar oft in unmittelbarer Nähe von Schleimfäden sowohl in- wie auch außerhalb der proliferierten Zellen P.A.S.-positive Granula, die sich auch mit Toluidin-Blau metachromatisch anfärbten und die Speichelprobe bei Lagerung innerhalb von Zellen überstanden, aber daraus ist nicht der Schluß zulässig, daß es sich einwandfrei um in Resorption befindliche Schleimpartikel handelt.

Es liegen Beobachtungen von STOLPMAN (1962) vor, die zeigen, daß in jungen aktiven Bindegewebszellen solche P.A.S.-positive und metachromatische Granula auftreten, die als Vorstufen der Grundsubstanz aufzufassen sind.

Nach diesen Beobachtungen und auf Grund der Tatsache, daß nicht immer Schleim in der Nachbarschaft der reaktiv auftretenden Bindegewebszellen liegt, können wir darin keinen Beweis sehen, daß etwa Schleim phagozytiert und in Form von Granula gespeichert worden wäre, obwohl die in diesen Zellen auftretenden Körnchen die Farbreaktionen für Schleimsubstanzen geben.

Obwohl wir bei den ersten Versuchen eine Woche nach der Implantation makroskopisch keinen Schleim in der Subcutis mehr gefunden haben, geht offensichtlich die Resorption des Schleims nicht schnell vor sich. Bei den ersten Versuchen konnten wir nämlich Schleimreste noch im Implantationsgebiet mikroskopisch nachweisen, auch bei allen anderen Versuchsreihen sind Schleimreste z. T. auch noch makroskopisch in der Subcutis sieben Tage nach der Implantation wahrzunehmen. Dies weist darauf hin, daß die Resorption nicht nach dem Prinzip der einfachen Aufsaugung wie etwa bei Salz- oder kolloidalen Lösungen erfolgt, sondern daß für den Schleim eine vorbereitende Erschließung notwendig ist.

Die quantitative Bestimmung des Hexosamins in der Spülflüssigkeit der SELYE-Granulom-Taschen vier Tage nach Auffüllung derselben mit Trockenschleimlösung ergab nur noch ein Viertel an Hexosamin gegenüber der in der injizierten Schleimlösung nachgewiesenen Hexosaminmenge. Daraus ist auf eine echte Resorption von Schleim zu schließen. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, daß mit 0,5 % eine sehr niedrig konzentrierte Trockenschleimlösung in die SELYE-Taschen gespritzt worden war (nativer Schleim enthält das 40-fache dieser Menge an Trockensubstanz), und daß die durch Luft erzeugte Tasche (20 cm^3) im Vergleich zu der eingespritzten Flüssigkeit (4 cm^3) so groß war, daß sie für die Resorption der Schleimlösung ein Vielfaches an Fläche zur Verfügung stellte als bei den in die Inguinalgegend vorgenommenen Implantationen.

Wenn Schleim aus einer Schleimdrüse ins Gewebe statt nach außen gelangt, wird die Resorption, wie LETTERER betont, schwierig.

Die Befunde bei den Tieren, denen der Schleim in die Bauchhöhle verabreicht worden war und bei denen nur noch sehr dünnflüssiger oder gar kein Schleim mehr bei der Sektion nachgewiesen werden konnte, könnten Ausdruck einer erhöhten Resorbierbarkeit des Schleims sein, infolge einer ausgedehnteren resorbierenden Gewebsfläche.

In Anbetracht der schweren Löslichkeit des Trockenschleims und seiner verhältnismäßig leichten Resorbierbarkeit im Falle einer geringen Konzentration möchten wir meinen, daß Zähigkeit bzw. physikalischer Zustand zu einem wesentlichen Teil die Resorbierbarkeit bestimmen.

Unsere Versuche sprechen dafür, daß der Schleim erst dann leicht aufgesaugt wird, wenn er sehr dünnflüssig vorliegt, etwa in einer Konzentration unter 2 %. Aber die Verflüssigung reicht als solche nicht zur Resorption aus, die die histiogene Zellproliferation und offensichtlich die weitere Erschließung des Fremdmaterials bewirken. Ob hierbei physikalische oder chemische Zustände den Ausschlag geben, läßt sich nicht entscheiden.

Die Ursache der schlechten Verarbeitung des Schleims durch die ortsständigen Gewebe in den Fällen, in denen er in einem Kanälchen eines durchbohrten Holunderstäbchens lag, möchten wir in dem Umstand sehen, daß in diesen Fällen erstens der ohnehin schlecht lösbare Schleim nur an zwei verhältnismäßig kleinen Stellen - obere und untere Kanalöffnung - mit dem Exsudat in Berührung kommen konnte, und zweitens daß der durch die schwere eitrige Entzündung nachgewiesene schwere durch das Holundermark gegebene Reiz die Gewebsreaktionen beeinflußt hat. Darüber hinaus geben diese Versuche einen Hinweis auf die Bedeutung der Fibro- und Histiozyten, die in diesen Fällen nur vereinzelt oder gar nicht mit dem Schleim in Berührung gekommen sind.

Der Versuch, Hexuronsäuren im Schleim spektrophotometrisch nachzuweisen, wurde fallen gelassen, da sich im Schleim Substanzen befinden, die die Farbreaktion - wenn überhaupt eine solche erzielt worden wäre - überdeckt hätten.

Somit konnten wir die Methode von DISCHE nicht zur Identifizierung der im Schleim enthaltenen Stoffe heranziehen. Das im Schleim vorhandene Hexosamin ließ sich durch die Methode nach ELSON - MORGAN zuverlässig nachweisen.

Wir haben daher in die Bauchhöhle von Ratten Schleim eingebracht und einige Tage nach der Implantation versucht, das Hexosamin in der Bauchhöhle der Tiere nachzuweisen, um nach Vergleich mit der Hexosaminmenge, die in der einverleibten Trockenschleimlösung enthalten war, die Eliminierung des Schleims chemisch nachweisen zu können.

Die Analysenergebnisse dieser Versuchsreihe sind wegen der Verunreinigung der Spülflüssigkeit, von der die Analyse ausgehen mußte, kaum verwertbar gewesen. Anschließend haben wir versucht, die Resorption des in Lösung befindlichen Schleims bzw. des Hexosamins mit Hilfe der Granulomtaschen nach SELYE chemisch zu überprüfen.

Acht Tage nach Einbringung der Schleimlösung fand sich in den SELYE-Taschen ein Hexosamingehalt, der sich kaum von dem der wassergefüllten Taschen unterschied. Dieses bei den letzteren nachgewiesene Hexosamin könnte von der Grundsubstanz herrühren, die bei der Bildung der Cystenwand entstanden ist. Junges Bindegewebe enthält in seiner Grundsubstanz bekanntlich erhöht Polysaccharidmengen.

Die unregelmäßige Gestaltung der Innenwand der SELYE-Taschen nach ihrer Füllung mit Schleim stellt, so glauben wir, den Versuch des Gewebes dar, eine größere Oberfläche bereitzustellen, um den eingespritzten Schleim zu resorbieren.

Daß der Schleim am Ende vom Gewebe resorbiert wird, glauben wir hinreichend gezeigt zu haben; jedoch hängt die Resorbierbarkeit des Schleims außer von seiner Viskosität und der Ausdehnung des mit ihm in Berührung kommenden Gewebes auch von weiteren Faktoren ab, wie Beimengungen, die in ihm enthalten sind, und von dem Grad der Beeinflussung der Gewebsreaktionen durch dieselben Beimengungen.

Was schließlich das Schicksal des Schleims bzw. der in ihm enthaltenen Stoffe anlangt nach der erfolgten Resorption, können wir auf Grund der angestellten Versuche nicht entscheiden.

Prinzipiell besteht die Möglichkeit der Einbeziehung der im Schleim enthaltenen Stoffe in den allgemeinen Stoffwechsel - z.B. über die Leber nach Depolymerisation der Mucopolysaccharidketten und Befreiung der einzelnen Oligo- und Monosaccharide - und die Möglichkeit der Verarbeitung und Verwertung des Schleims an Ort und Stelle.

Die beobachtete Granulierung in den Leberzellen, die nach Speicheleinwirkung geschwunden ist, könnte alimentärer Herkunft sein und kann zur Stützung der ersten Möglichkeit nicht herangezogen werden.

Die zweite Möglichkeit, daß nämlich der Schleim an Ort und Stelle verwertet wird im Sinne einer Benutzung seiner Komponenten für die Bildung der Grundsubstanz, konnte mit den verwendeten Mitteln nicht bewiesen werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Bildung der Bindegewebsfasern durch die Fibroblasten in Form einer zellulären Sekretion erfolgt, hätte im Falle einer Verwertung des Schleims das Implantat von diesen Zellen erst aufgenommen und anschließend sezerniert werden müssen.

Die in den gewucherten jungen Bindegewebszellen beobachteten Granula sind indessen kein sicherer Ausdruck einer solchen Speicherung.

Eine Resorption von Schleim seitens des Lymphsystems, wie sie manche Autoren annehmen, haben wir nicht beobachten können.

Zusammenfassung

Zervikalschleim von trächtigen und nicht-trächtigen Kühen wurde gefriergetrocknet und in Form von Trockenschleim als auch von Schleim-Wasser-Gemischen Mäusen in die Subcutis der Leistengegend wie in die Bauchhöhle eingepflanzt.

Die Tiere wurden sieben Tage nach der Implantation getötet. Wir stell-

ten fest, daß der verabreichte Schleim bei neun Tieren von zwölf makroskopisch nicht mehr zu sehen war. Mikroskopisch hatte der implantierte Schleim ein Granulationsgewebe induziert, durch das das Implantat organisiert wurde. Die dabei auftretenden Zellen stellen Histiozyten und Fibroblasten dar. Weitere Implantationsversuche nach Implantation von Schleim in Holundermark ergaben, daß der Schleim zuerst eine seröse Entzündung hervorruft mit dem Ergebnis einer Aufquellung und einer Viskositätsabnahme.

Der serösen Entzündung folgt eine proliferative Entzündung. Das proliferierende Gewebe dringt in den Schleim ein, saugt ihn auf und ersetzt ihn am Ende. Es liegt also ein gewöhnlicher Organisationsprozess vor.

Weiter haben wir den Schleim hydrolysiert und seinen Hexosamingehalt bestimmt. Es fand sich, daß das in unserem Schleim enthaltene Hexosamin in einer Konzentration von etwa 12 % des Trockengewichts vorliegt.

Ferner wurde der Schleim mit Rattenserum inkubiert. Dieser Versuch gab keinen Hinweis auf eine Spaltung des Schleims durch das Serum, gemessen an der Freisetzung von Hexosamin.

Schließlich wurde die Schleimlösung unter die Rückenhaut der Ratte in eine Lufttasche eingebracht. Die nach einigen Tagen gebildete aus Granulationsgewebe bestehende Cyste wurde in toto entfernt.

In den Granulomtaschen wurde nach vier Tagen nur noch ein Viertel der ursprünglichen Hexosaminmenge festgestellt. Nach weiteren vier Tagen fand sich ein Hexosamin-Spiegel ähnlich jenem, der nur mit Wasser gefüllten Cysten.

Mikroskopisch hatte die Schleimlösung eine dichte Zellproliferation und eine unregelmäßige Gestaltung der Taschenwand verursacht im Gegensatz zu den zellarm, locker und regelmäßig gebauten Taschenwänden, die nur mit Wasser in Berührung gekommen waren.

Sowohl histologisch als auch chemisch wurde bestätigt, daß Schleim im Gewebe prinzipiell resorbierbar ist.

Es wird anschließend die Resorbierbarkeit des Schleims diskutiert, die Bedeutung seiner Consistenz für diesen Vorgang und die Tätigkeit der Makrophagen erörtert.

Für die Resorbierbarkeit von Schleimsubstanzen wird die Bedeutung der resorbierenden Gewebsflächen und der Resorptionsort für wichtig erachtet.

Schließlich wird die Frage erörtert nach dem Schicksal des Schleims im Organismus nach der Resorption.

Literaturverzeichnis

BLIX, G. und GARDELL, S.: Mucopolysaccharide und Glycoproteide (Im Handbuch der Physiologisch und Pathologisch-chemischen Analyse von HOPPE-SEYLER-THIERFELDER; Bd. IV, Teil I, 662 (1960).

BOAS, N. F.: Method for the determination of Hexosamines in Tissues. J. Biol. chem. 204, 553 (1953).

DISCHE, Z.: A new specific color reaktion of hexuronic acids. J. Biol. chem. 167, 189 (1947).

DISCHE, Z.: A modification of the carbazole reaction of Hexuronic acids for the study of Polyuronids. J. Biol. chem. 183, 489 (1950).

ELSON, L. A. und MORGAN, W. T. J.: A colorimetric Method for the Determination of Glucosamine and chondrosamine. Bioch. Journal 27, 1824 (1933).

FRAENKEL, E.: Ueber das sogenannte Pseudomyxoma peritonei. Münch. med. Woch. 24, 965 (1901).

FRAENKEL, E.: Ueber das sogenannte Pseudomyxoma peritonei. Münch. med. Woch. 21, 1142 (1912).

HAMPERL, H.: Über "Schleimgranulome" und "glanduläre Erosionen" in die Speicheldrüsen und der Magenschleimhaut. Ziegler's Beitr. 88, 193 (1932).

HAMPERL, H.: Über Reaktionen auf Schleim bes. in der Lunge. Verh. Dtsch. Pathol. (S. 125), (1944).

HUETER, C.: Zur Frage des Pseudomyxoma peritonei beim Manne. Ziegler's Beitr. 41, 517 (1907).

KRETSCHMAR, K.: Über das Pseudomyxoma peritonei. Monatsschr. f. Geburtsh. (Ergänzungsheft) 32 (1897).

LETTERER: Die Pathologie der Mucine und Mucoide (Im Lehrbuch der allg. Pathologie) (1959).

LISON, L.: Histochimie animale. (1936).

ODIN, L.: Mucopolysaccharides of epithelial Mucus (Im: CIBA-Symposion on Mucopolysaccharides). 234 (1958).

ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. (1948).

ROULET, F.: Methoden der pathol. Histologie. (1948).

SCHETTLES, B., DISCHE, Z, und OSNOS, M.: Neutral Mucololysaccharides of the human cervical Mucus. J. Biol. Chem. 192, 579, 1951.

SCHILLING, F.: Beitrag zur Kenntnis der Parotisgeschwülste. Ziegler's Beitr. 68, 139, 1921.

SELYE, H.: Use of "Granuloma Pouch" Technic in the study of Antiphlogistic Corticoids. Proc. Soc. f. Exper. Biol. and Med. 82, 328 (1953).

STACEY, M.: General chemistry of Mucopolysaccharides (Im: CIBA-Symposion on Mucopolysaccharides) 4 (1958).

STOLPMANN, H.J.: Zur Ortho- und Pathologie des Lungengerüstes. Frankf. Zeitschr. f. Pathol. 71, 511 (1962).

WENDELER, P.: Über einen Fall von Peritonitis chronica productiva myxomatosa nach Ruptur eines Cystadenoma glandulare ovarii. Monatsschr. f. Geburtshilfe 3, 186 (1896).

WERNER, J.: Studies on the chemistry of epithelial mucus. Acta med. Upsal. 58, 1 (1953).

WERTH, G.: Klinische und anatomische Untersuchungen zur Lehre von den Bauchgeschwülsten und der Laparotomie; II. Pseudomyxoma peritonei. Arch. f. Gynäkologie 24, 100 (1884).

ZACHARIAE, F. und DYRBYE, M.O: Methods for isolation and identification of acid Mucopolysaccharides in connective tissue Acta Rheum. Scand. 5, 190,1959.

Herrn Professor Dr. med. W. Maßhoff danke ich für die Unterstützung während der Arbeit und die sorgfältige Korrektur des Manuskripts.

Der technischen Assistentin Frl. Grabe sowie den übrigen Assistentinnen des histologischen Laboratoriums im Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin danke ich für ihre hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate.

Lebenslauf

Am 17. Februar 1939 wurde ich, Antonios Risos, als Sohn des Frauenarztes Athanassios Risos und seiner Ehefrau Mina geb. Sapka in Larissa/Griechenland, geboren. Nach sechs Grundschuljahren besuchte ich die Oberschule in Larissa, an der ich im Juli 1956 die Reifeprüfung ablegte.

Im Herbst 1956 immatrikulierte ich mich in der Universität Heidelberg, in der ich zwei Semester studierte. Anschließend, im Herbst 1957, wurde ich in der Freien Universität Berlin immatrikuliert. Die ärztliche Vorprüfung legte ich im Frühjahr 1959 dort ab. Die ärztliche Prüfung bestand ich an der gleichen Universität im November 1962.

Den Krankenpflegedienst absolvierte ich im Frühjahr 1957 in der Universitätsklinik Bonn. In dem American Army Hospital Berlin (Innere Abteilung), dem Gertrauden-Krankenhaus (Chirurgische Abteilung) und dem Kaiserin Augusta-Victoria Haus führte ich meine Tätigkeit als Famulus durch.

Im Juni 1960 begann ich im Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Maßhoff mit der Anfertigung vorliegender Dissertation, die ich im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin unter den Anweisungen von Herrn Priv. Doz. Dr. Koransky fortgesetzt und abgeschlossen habe.